
Experimentelle Forschung Pharma
Schering AG Berlin
Department Endokrinpharmakologie
Leiter: Priv.-Doz. Dr. F. Neumann

**Zur hormonalen Prägung
von hypothalamischen Zentren,
die die Prolaktinsekretion kontrollieren**

(Untersuchungen an Ratten
unter spezieller Berücksichtigung des Zeitfaktors)

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Bernhard Berger
aus Weiler/Allgäu

1972

Experimentelle Forschung Pharma
Schering AG Berlin
Department Endokrinpharmakologie
Leiter: Priv.-Doz. Dr. F. Neumann

**Zur hormonalen Prägung
von hypothalamischen Zentren,
die die Prolaktinsekretion kontrollieren**

(Untersuchungen an Ratten
unter spezieller Berücksichtigung des Zeitfaktors)

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Bernhard Berger
aus Weiler/Allgäu

Referent: Priv. - Doz. Dr. F. Neumann
Korreferent: Professor Dr. P. Schmialek



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 29. März 1972

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	
	A. Der Einfluß vom Sexualhormonen in der Differenzierungsphase der im Hypothalamus gelegenen Sexual- zentren.	Seite 1
	B. Die hormonabhängige Differenzierung des PIF-Zentrums.	Seite 6
	1. Prolaktin im kybernetischen Funk- tionsdreieck ZNS-Hypophyse-Keim- drüse	Seite 8
	2. Die androgenabhängige Differen- zierung des PIF-Zentrums	Seite 11
	3. Aufgabenstellung der Arbeit	Seite 14
II.	MATERIAL und METHODEN	Seite 15
	1. Milchdrüsengewichte	Seite 16
	2. Whole Mount Preparation	Seite 17
	3. Histologie	Seite 18
	4. DNS-Bestimmung	Seite 18
III.	ERGEBNISSE	Seite 23
IV.	DISKUSSION	Seite 54

V.	ZUSAMMENFASSUNG	Seite 63
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	Seite 65
VII.	DANKSAGUNG	
VIII.	LEBENS LAUF	

I. EINLEITUNG

A. Der Einfluß von Sexualhormonen in der Differenzierungsphase der im Hypothalamus gelegenen Sexualzentren

Die Meinung, daß im Augenblick der Befruchtung bestimmt wird, ob ein männliches oder weibliches Individuum entsteht, mußte seit den Untersuchungen von Pfeiffer (1936) revidiert werden. Pfeiffer kastrierte männliche Ratten in den ersten Tagen nach der Geburt. Nach Ovarimplantation beobachtete er im Erwachsenenalter eine normale Ovarialfunktion mit Ovulation und Corpus luteum-Bildung. Im Gegenversuch kastrierte er weibliche Ratten in den ersten Tagen nach der Geburt und implantierte ihnen männliche Gonaden. Nach darauffolgender Ovarimplantation zeigten diese Ovarien im Erwachsenenalter keine normale Funktion, d.h. keine Ovulation und keine Corpus luteum-Bildung. Vaginalabstriche zeigten einen Daueröstrus an.

Nachdem im Jahre 1932 Hohlweg und Junkmann (Hohlweg und Junkmann 1932) zum erstenmal das kybernetische Funktionsdreieck Zentralnervensystem - Hypophyse - Keimdrüse konzipierten und McCann und Mitarbeiter (McCann und Friedman 1960) nachgewiesen haben, daß im Hypothalamus

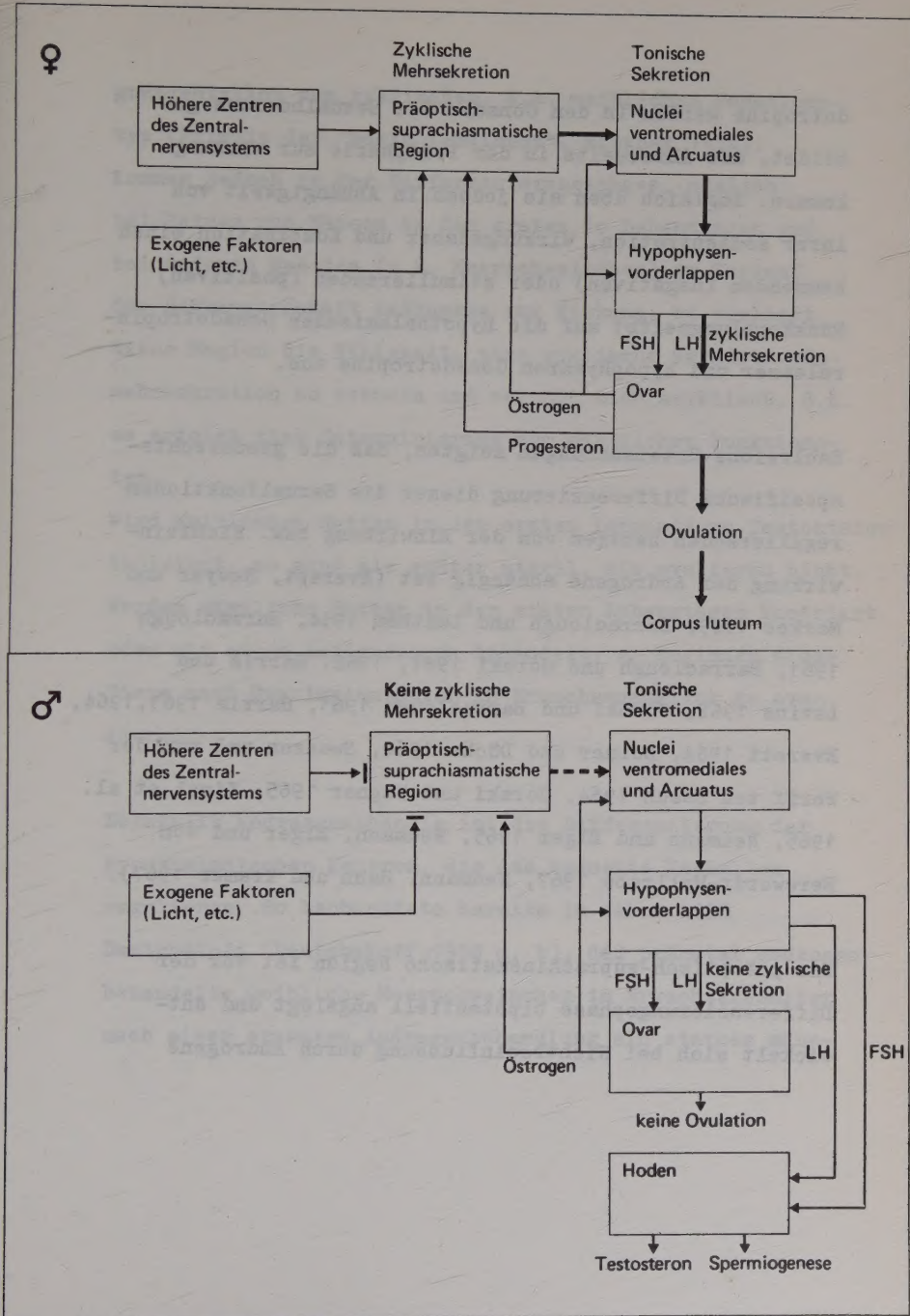
sogenannte Gonadotropinreleaser gebildet werden, die über den hypothalamohypophysären Portalkreislauf die Sekretion der hypophysären Gonadotropine anregen, lokalisierten schließlich Barraclough und Gorski (1961) durch intrahypothalamische Stimulationen ein Sexualzentrum und unterschieden eine präoptische suprachiasmatische Region, die für eine zyklische Gonadotropinmehrsekretion verantwortlich ist und ein caudales in den Nuclei ventromediales und Arcuatus gelegenes Zentrum, das eine tonische Gonadotropinsekretion regelt.

Das kybernetische Funktionsdreieck kann folgendermaßen beschrieben werden (Abb. 1):

In basalen mittleren Hypothalamuskernen werden FSH- und LH-Releaser sezerniert, die über den hypothalamohypophysären Portalkreislauf zum Hypophysenvorderlappen gelangen und die FSH- und LH-Sekretion anregen.

Im weiblichen Organismus beeinflusst zusätzlich ein Zentrum in der präoptischen suprachiasmatischen Region die LH-Releaser-Sekretion im Sinne einer rhythmischen Mehrsekretion, die zu einer zyklischen Mehrausschüttung des hypophysären LH führt. Die zyklische Funktion ist die Voraussetzung für eine Ovulation und kann geprüft werden an der Corpus luteum-Bildung. Unter dem Einfluß der Gona-

Abb.1



dotropine werden in den Gonaden die Sexualhormone gebildet, die ihrerseits in der Peripherie zur Wirkung kommen. Zugleich üben sie jedoch in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, Wirkungsdauer und Kombination einen hemmenden (negativen) oder stimulierenden (positiven) Rückkopplungseffekt auf die hypothalamischen Gonadotropin-releaser und hypophysären Gonadotropine aus.

Zahlreiche Untersuchungen zeigten, daß die geschlechtsspezifische Differenzierung dieser die Sexualfunktionen regulierenden Zentren von der Einwirkung bzw. Nichteinwirkung der Androgene abhängig ist (Everett, Sawyer und Markee 1949, Barraclough und Leathem 1954, Barraclough 1961, Barraclough und Gorski 1961, 1962, Harris und Levine 1962, Gorski und Barraclough 1963, Harris 1963, 1964, Everett 1964, Dörner und Döcke 1964, Swanson und van der Werff ten Bosch 1964, Gorski und Wagner 1965, Kincl et al. 1965, Neumann und Elger 1965, Neumann, Elger und von Berswordt-Wallrabe 1967, Neumann, Hahn und Kramer 1967).

Die präoptisch-suprachiasmatische Region ist vor der Differenzierungsphase bipotentiell angelegt und entwickelt sich bei Nichtbeeinflussung durch Androgene

grundsätzlich zum zyklischen, d.h. weiblichen Funktions-
typ (Prinzip der "basic femalness", Wiesner 1934).

Kommen jedoch in der Differenzierungsphase, nämlich
bei Ratten und Mäusen in den ersten 10 Lebenstagen und
bei anderen Spezies (z.B. Meerschweinchen) im Verlauf
der Schwangerschaft Androgene zur Wirkung, so verliert
diese Region die Fähigkeit, eine zyklische Gonadotropin-
mehrsekretion zu steuern und verhält sich azyklisch, d.h.
es erfolgt eine Determinierung zum männlichen Funktions-
typ.

Wird weiblichen Ratten in den ersten Lebenstagen Testosteron
injiziert, so sind sie später steril, sie ovulieren nicht.
Werden männliche Ratten in den ersten Lebenstagen kastriert
oder mit einem Antiandrogen behandelt, so beginnen diese
Tiere nach Ovarimplantation im Erwachsenenalter zu ovu-
lieren.

Ebenfalls androgenabhängig ist die Differenzierung der
hypothalamischen Zentren, die das sexuelle Verhalten
regulieren. So beobachtete bereits im Jahre 1938
Dantchakoff (Dantchakoff 1938 a, b), daß pränatal androgen-
behandelte weibliche Meerschweinchen im Erwachsenenalter
nach einer erneuten Androgenbehandlung ein starkes männ-

liches Sexualverhalten zeigten.

Im Jahre 1941 berichteten Wilson und Mitarbeiter (Wilson und Young 1941) über ihre Versuche an Ratten:

Neonatal mit Androgen behandelte Rattenweibchen zeigten postpuberal ein stark reduziertes weibliches Verhalten. Phönix und Mitarbeiter (Phönix et al. 1959) bestätigten diese Ergebnisse und zogen daraus die Schlußfolgerung, daß in der Organisationsphase der Androgenspiegel verantwortlich ist für die Differenzierung der für den Paarungstrieb verantwortlichen Zentren, während im Erwachsenenalter die Sexualhormone den determinierten Trieb aktivieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Ausschüttung der Gonadotropine und im sexuellen Verhalten auf hypothalamische Prägungsvorgänge zurückzuführen sind, die artunterschiedlich in der perinatalen oder pränatalen Periode erfolgen. Verantwortlich für diese Vorgänge sind die Androgene. Ohne Einwirkung der Androgene würden sich diese Zentren grundsätzlich weiblich determinieren.

B. Die hormonabhängige Differenzierung des PIF-Zentrums

Zum besseren Verständnis ist es notwendig, zunächst auf die Bedeutung des Prolaktins einzugehen:

Schon in frühen Untersuchungen fand man, daß die Ovarhormone Östradiol und Progesteron nur eine geringe Stimulierung des Milchdrüsenwachstums hervorrufen, wenn sie nicht mit dem Prolaktin zusammenwirken (Lyons und Pencharz 1936, Reece, Turner und Hill 1936, Gomez und Turner 1936, 1937, Nathanson, Shaw und Franseen 1939, Reece und Leonard 1941, 1942, Gardner und White 1941, 1942, Mixner und Turner 1942, 1943, Gomez 1942, Lyons, Simpson und Evans 1942, 1943, Lyons 1943, 1950, Reece und Leatham 1945, Mayer und Klein 1948, Trentin und Turner 1948, Hahn und Turner 1966).

Östradiol allein bewirkt allenfalls eine Stimulierung des Gangsystems, während Progesteron nur im Zusammenwirken mit Prolaktin einen Einfluß auf die Differenzierung zum lobulo-alveolären Aufbau besitzt (Traurig und Morgan 1964 a, b).

So findet man folgerichtig bei Spezies mit kurzen Sexualzyklen (Ratte und Maus), in der eine Lutealphase nur sehr kurz auftritt, vorwiegend das Gangsystem entwickelt

(Astwood, Geschickter und Rausch 1937, Cole 1933, Fekete 1938, Freyer und Evans 1923, Gardner und Strong 1935, Hammond und Marshall 1930, Parkes 1926, Schultze und Turner 1933, Turner und Gomez 1933, Turner und Schultze 1931, Weichert, Boyd und Cohen 1934). Zur vollen Ausbildung der Milchdrüse kommt es nur, wenn die Lutealphase durch Schwangerschaft oder Pseudogravidität verlängert ist. Bei Spezies mit langer Lutealphase dagegen (z.B. Hund) kommt es schon während des normalen Zyklus zu einem lobulo-alveolären Aufbau (Marshall und Halnan 1917).

Prolaktin wird in den acidophilen Zellen des Hypophysenvorderlappen gebildet (Farquar und Rinehart 1954, Hymer, McShan und Christiansen 1961, Barnett, Roth und Saizer 1961, Purves 1961, Rennels 1962, Girod 1962, Benoit und Dalage 1963, Tixier-Vidal 1963, Olivereau 1963, Desclin 1963, Barnes 1963, Emmart, Spicer und Bates 1963, Grosvenor, McCann und Nallar 1965) und konnte 1933 isoliert werden (Hiddle, Bates und Dykshorn 1933).

Es ist ein Proteinhormon mit einem Molekulargewicht von 24200 und einem IEP bei pH 5,6 - 5,7 (Li, Lyons und Evans 1941, Li, Simpson und Evans 1942, White, Bonsnes und Long 1942, Li et al. 1954, Li 1957, Li, Cole und Coval 1957, Li und Cummins 1958).

Prolaktin besitzt eine direkte mammogene Wirkung (Lyons, Simpson und Evans 1941, Gardner und White 1941, Lyons 1942, Mizuno, Iida und Naito 1955, Ferguson 1956, Lyons, Li und Johnson 1956, Mizuno und Naito 1956, Lyons, Johnson und Li 1957).

Versuche an hypophysektomierten Tieren zeigen, daß ein voller lobulo-alveolärer Aufbau des Milchdrüsenparenchyms ohne Prolaktinegaben nicht möglich ist (Reece und Leonhard 1939, 1942, Lyons, Simpson und Evans 1942, Lyons 1958, Nelson 1950, 1952, Lyons et al. 1953, Lyons, Li und Johnson 1958). Neben der Stimulation des Gangwachstums und des lobulo-alveolären Aufbaus beeinflußt Prolaktin auch im wesentlichen die Proliferation des Sekretgewebes und die Auslösung der Laktation (Mizuno, Iida und Naito 1955).

1. Prolaktin im kybernetischen Funktionsdreieck ZNS-Hypophyse-Keimdrüse

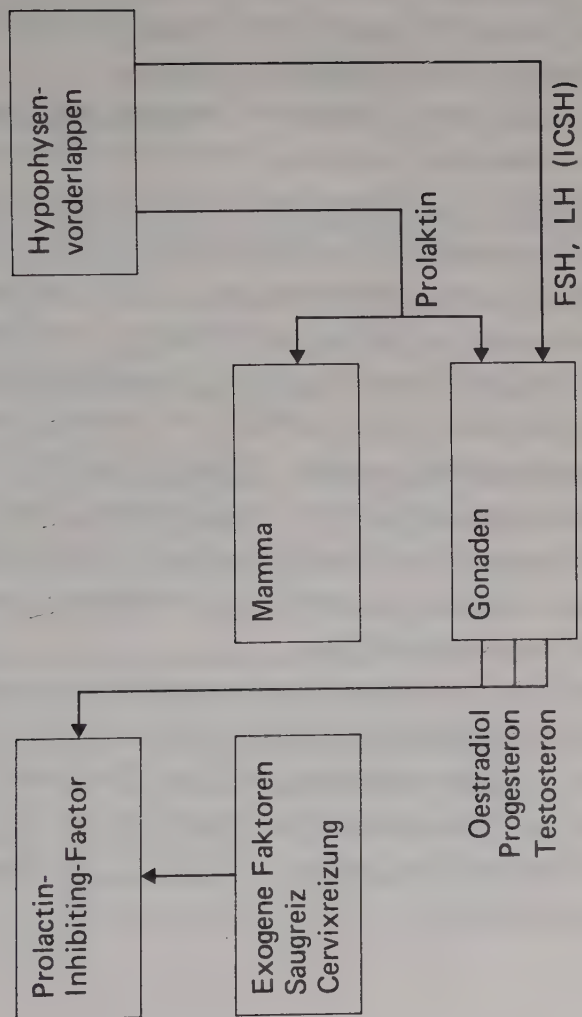
Die hypophysäre Prolaktinausschüttung steht unter dem permanent hemmenden Einfluß eines übergeordneten Zentrums im Hypothalamus (McCann und Friedmann 1960, Nicoll und Meites 1962, Sawyer et al. 1963, Kanematsu, Hilliard und Sawyer 1963, Kobayashi et al. 1963, Ben-David, Dikstein und Sulman 1964, Ramirez und McCann 1964,

Grosvenor, McCann und Nallar 1965, Nikitovitch-Winer 1965, Mishkinsky, Lajtos und Sulman 1966, Robboy und Kahn 1966, DeVoe, Ramirez und McCann 1966, Kuroshima et al. 1966, Sar und Meites 1967, Arimura et al. 1967, Grosvenor et al. 1967, Dhariwal et al. 1968).

Eine Senkung dieses "PROLACTIN-INHIBITING-FACTOR" (PIF) oder eine Durchtrennung der Verbindungslinie Hypothalamus - Hypophyse führt zu einer vermehrten Prolaktinsekretion im Hypophysenvorderlappen. Es besteht jedoch kein geschlossener Regelkreis, wie etwa bei dem Gonadotropinsystem, da das Prolaktin keinen Rückkopplungseffekt auf die Zentralstelle im Hypothalamus besitzt. Vielmehr wird die PIF-Sekretion durch eine Reihe prolaktinunabhängiger Faktoren reguliert (Abb. 2):

An erster Stelle ist hier das weibliche Keimdrüsenhormon Östradiol zu nennen. Durch Hemmung der PIF-Sekretion und somit Stimulierung der Prolaktinausschüttung besteht zwischen Östradiol und Prolaktin eine positive feed-back-Beziehung (Everett 1964, Kanematsu und Sawyer 1963, Ratner, Talwalker und Meites 1963, Ratner und Meites 1964, Ramirez und McCann 1964, Meites und Nicoll 1966, Tucker, Paape und Sinha 1967, Chowers und McCann 1967, Minaguchi, Clemens und Meites 1968).

Abb. 2



Die durch in-vitro-Versuche festgestellte direkte Wirkung des Östradiols auf die Hypophyse ohne Zwischenschaltung des Hypothalamus (Meites und Nicoll 1966, Kanematsu und Sawyer 1963) spielt unter physiologischen Bedingungen sicherlich eine untergeordnete Rolle.

Die experimentell gesicherte feed-back-Beziehung zwischen Progesteron und Prolaktin (Rotchild und Dickey 1960, Wolthuis 1963, Wolthuis und DeJongh 1963, Sar und Meites 1968) kommt unter physiologischen Bedingungen nicht zum Tragen, da das Progesteron noch eine gegensätzliche Wirkung hat: es hebt gleichzeitig die stimulierende Wirkung des Östradiols auf die Prolaktinausschüttung auf und macht darüberhinaus die Milchdrüse während der Schwangerschaft gegenüber Prolaktin refraktär (Meites und Sgouris 1953, Meites 1954, Steinbeck 1969). Erst durch Abfall des Progesteronspiegels bei der Geburt kommt es zur gesteigerten Prolaktinausschüttung und zur Laktationsauslösung.

Ebenfalls in positiver feed-back-Beziehung zum Prolaktin stehen Testosteron (Wolthuis 1963, Ahren und Etienne 1959, Chowers und McCann 1967, Sar und Meites 1968) und die Nebennierenrindenhormone (Ben-David, Dikstein und Sulman 1964, Sulman et al. 1963, 1964, Sar und Meites 1968).

An exogenen Faktoren sind zu nennen der Saugreiz (Ratner und Meites 1964, Grosvenor, Mena und Schaeffgen 1967, Tucker, Paape und Sinha 1967) und die Cervix-Reizung durch den Coitus (Kuroshima et al. 1966), die über eine Verminderung des PIF im Hypothalamus eine Prolaktinausschüttung bewirken.

2. Die androgenabhängige Differenzierung des PIF-Zentrums

Rattenweibchen, die in ihrer Foetalperiode Androgenen ausgesetzt waren - durch Behandlung gravider Mütter mit Androgenen - zeigen nach entsprechender Stimulierung ein stark reduziertes Milchdrüsenwachstum (Kumaresan und Turner 1966).

Umgekehrt ist das Milchdrüsenwachstum männlicher Ratten, bei denen in der Foetalperiode die Androgenwirkung ausgeschaltet wurde - durch Behandlung der graviden Mütter mit einem Antiandrogen - sehr viel ausgeprägter als das der männlichen Kontrollen (Neumann und Elger 1967).

Die erste Vermutung, daß bei männlichen Tieren infolge der Androgenwirkung primär weniger Milchdrüsengewebe angelegt wird, so daß dann einfach weniger Substrat vorhanden ist, das auf einen entsprechenden Stimulus mit Wachstum reagieren kann, konnte durch die Arbeitsgruppe Rieser, Schulz und Neumann (1970) widerlegt

werden, indem gefunden wurde, daß bei neugeborenen Ratten, unabhängig vom Geschlecht und unabhängig von einer Hormonbehandlung der Mütter, keine Unterschiede in der Ausbildung des Milchdrüsengewebes bestand. Auch bei 30 Tage alten Tieren, d.h. kurz vor der Pubertät, war das Bild noch einheitlich.

Die Schlußfolgerung war, daß der positive Rückkopplungseffekt zwischen Östrogen und Prolaktin geschlechtsspezifisch in der Art arbeitet, daß der PIF bei weiblichen Ratten durch Östrogene stärker gehemmt wird als bei männlichen.

Eine Unterstützung dieser Auffassung fand man in den Arbeiten von Kurcz und Mitarbeitern (Kurcz et al. 1967), die zeigen konnten, daß die hypophysäre Prolaktinmenge männlicher Ratten im Vergleich zu den weiblichen Tieren etwa um die Hälfte reduziert ist. Kein Unterschied bestand jedoch zu solchen Weibchen, die sofort nach der Geburt mit Testosteronpropionat behandelt wurden. Von Hasselbach (1970) konnte den Beweis erbringen, daß die fetalen und neonatalen Androgene einen prägenden Einfluß auf das hypothalamische PIF-Zentrum besitzen: Im Einklang mit dem durch zahlreiche Untersuchungen nachgewiesenen Einfluß der Androgene auf die Differenzierungsvorgänge der hypothalamischen Zentren für die

Steuerung der Sexualfunktion und des sexuellen Triebverhaltens (Everett, Sawyer und Markee 1949, Barraclough und Leathem 1954, Barraclough 1961, Barraclough und Gorski 1961, 1962, Harris und Levine 1962, Gorski und Barraclough 1963, Harris 1963, 1964, Dörner und Döcke 1964, Swanson und van der Werff ten Bosch 1964, Gorski und Wagner 1965, Kincl et al. 1965, Neumann und Elger 1965, Neumann, Elger und von Berswordt-Wallrabe 1967, Neumann, Hahn und Kramer 1967, Dantchakoff 1938 a, b, Wilson und Young 1941, Phönix et al. 1959), ist auch die Programmierung des hypothalamischen PIF-Zentrums zum männlichen oder weiblichen Funktionstyp abhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit der Androgene während der Differenzierungsphase.

Auch hier hat das Prinzip der "basic femalness" (Wiesner 1934) seine Geltung: ohne eine Beeinflussung durch Androgene verläuft die Differenzierung grundsätzlich zum weiblichen Funktionstyp, kommen aber in der Differenzierungsphase Androgene zur Wirkung, so wird der männliche Funktionstyp geprägt, das wahrscheinlich eine herabgesetzte Empfindlichkeit der entsprechenden Rezeptoren des PIF-Zentrums für die die Prolaktinausschüttung regulierenden Faktoren bedeutet.

3. Aufgabenstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Zeitpunkt in der fetalen und neonatalen Entwicklung bei Ratten zu bestimmen, zu dem die Determinierung des hypothalamischen PIF-Zentrums zum weiblichen oder männlichen Funktionstyp erfolgt.

II. MATERIAL und METHODEN

Weibliche Sprague Dawley Ratten wurden im Proöstrus mit den Böcken zusammengebracht. Der Spermiennachweis im Vaginalsekret der Weibchen wurde als Tag 1 der Schwangerschaft gerechnet.

Die trächtigen Weibchen wurden in 12 Gruppen unterteilt. Zahl der Tiere, Behandlungszeitraum, verabreichte Substanz und Dosierung sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Substanzen Cyproteronacetat und Methyltestosteron wurden in Benzylbenzoat-Rizinusöl gelöst. Die Injektion erfolgte in das subkutane Gewebe des Rückens.

In den Gruppen 1 - 6 erfolgte die Behandlung während der Schwangerschaft. Am 22. Schwangerschaftstag entnahm man die Jungen durch Kaiserschnitt und ließ sie von Ammentieren großziehen.

Die Tiere aller Versuchsgruppen wurden bei einem Gewicht von ca. 40 g gonadektomiert.

Bei einem Gewicht der Ratten von ca. 200 g erzeugten wir durch subkutane Injektion von 10 µg Östradiol und 30 mg Progesteron täglich über 22 Tage eine Pseudoschwangerschaft. Die Tiere, die für die Whole Mount Preparation

Tabelle 1

Gruppe	Behandlungs- zeitraum (pränatal)	Behandlung subkutan (Dosis)	Anzahl der graviden Mütter
1	5. - 10. Tag	Methyltestosteron (10 mg/Tier/Tag)	10
2	10. - 15. Tag	Methyltestosteron (10 mg/Tier/Tag)	10
3	15. - 22. Tag	Methyltestosteron (10 mg/Tier/Tag)	10
4	5. - 10. Tag	Cyproteronacetat (10 mg/Tier/Tag)	10
5	10. - 15. Tag	Cyproteronacetat (10 mg/Tier/Tag)	10
6	15. - 22. Tag	Cyproteronacetat (10 mg/Tier/Tag)	10
7	Kontrollen		

Gruppe	Behandlungs- zeitraum (postnatal)	Geschlecht	Behandlung subkutan (Dosis)	Anzahl der Tiere
8	1. - 10. Tag	♀	Methyltestosteron (0,3 mg/Tier/Tag)	9
9	10. - 20. Tag	♀	Methyltestosteron (0,3 mg/Tier/Tag)	16
10	1. - 10. Tag	♂	Cyproteronacetat (0,3 mg/Tier)	15
11	10. - 20. Tag	♂	Cyproteronacetat (0,3 mg/Tier)	12
12	Kontrollen			

und Histologie bestimmt waren, wurden aus später zu erklärenden Gründen nur mit 10 µg Östradiol behandelt. Östradiol wurde in einem Benzylbenzoat-Rizinusöl-Gemisch und Progesteron in Sesamöl gelöst.

Am 23. Tag wurden die Tiere durch Chloroform getötet und sofort präpariert.

Die Weiterbehandlung erfolgte entsprechend der vierfachen Auswertung der Milchdrüsenentwicklung.

1. Milchdrüsengewicht
2. Whole Mount Preparation
3. Histologie
4. DNS-Bestimmung

1. Milchdrüsengewicht

(Munford 1964)

Die Wägung ist mehr ein Maß für die Funktion als für den Entwicklungsgrad, da das in den Drüsen enthaltene Sekret mitgewogen wird. Diese Methode ist aber gut geeignet, Unterschiede z.B. zwischen männlichen und weiblichen Tieren bei qualitativ gleichem Entwicklungsstand herauszustellen.

Technik:

Die Drüsenleiste wird vom Tierkörper abpräpariert, von Fett- und Bindegewebe befreit und gewogen.

2. Whole Mount Preparation

Diese grob-morphologische Methode ist geeignet für Spezies mit flachen Milchdrüsen, z.B. Labornager wie Ratte, Maus und Kaninchen.

Die Ausdehnung des Gangsystems, sowie die Anzahl der Knospen und Alveolen können genau bestimmt werden.

Die Aussagekraft dieser Methode ist jedoch um so größer, je geringer das Flächen- und Tiefenwachstum der Milchdrüse stimuliert wurde. Die Tiere dieser Untersuchungsreihe wurden daher nur mit 10 µg Östradiol über 22 Tage behandelt.

Technik:

Ein ausreichend großer Hautbezirk wird mit dem darunter liegendem Bindegewebe vom Tierkörper abgetrennt und im Bouin-schen Gemisch für 24 Stunden fixiert. Anschließend wird für mehrere Tage in 50 %igem Alkohol gespült und mit Alaun-Karmesin gefärbt. Überflüssiger Farbstoff wird durch mehrmalige Spülung mit 70 %igem Alkohol entfernt. Abschließend wird das Präparat in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Xylol eingelegt. Der Drüsenkörper wurde von der Haut abgezogen und insgesamt fotografiert. Zur besseren Beurteilung der Struktur wurden einzelne Ausschnitte in Vergrößerung fotografisch festgehalten.

3. Histologie

Die Histologie ist eine wertvolle Ergänzung zur Whole Mount Preparation und gibt Auskunft über Unterschiede und Veränderungen innerhalb der Gänge und Alveolen.

Technik:

Der abpräparierte Drüsenkörper wird im Bouin'schen Gemisch fixiert. Nach Spülung in Alkohol erfolgt die Einbettung in Paraffin (56°C). Von dem Material werden Serienschnitte angefertigt und mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt.

4. DNS-Bestimmung

Der DNS-Gehalt eines Organs ist direkt proportional seiner Zellzahl (Mirsky und Ris 1949, Kirkham und Turner 1953). Da sich der Kollagengehalt einer im Aufbau befindlichen Drüse kaum verändert (Harkness und Harkness 1956), zeigt ein Anstieg des DNS-Gehaltes während der Aufbau-phase immer eine Parenchymproliferation an.

Der totale DNS-Gehalt der Milchdrüse ist ein Parameter für den Entwicklungszustand, die Konzentration dagegen ein Maß für die Wachstumsrate (Greenbaum und Greenwood 1954, Griffith und Turner 1957, Kirkham und Turner 1954, Munford 1963, Turner, Williams und Hindery 1963,

Williams und Turner 1961).

Die DNS-Bestimmung ist die objektive Kontrolle der Whole Mount Preparation.

Technik: (Webb und Levy 1955, Moon, Griffith und Turner 1959).

Die Drüsen werden vom Tierkörper abgetrennt, in Trockeneis gelegt und für eine Woche bei -18°C tiefgefroren. Danach erfolgt die Fett- und Wasserextraktion durch je 4 Stunden langes Kochen in 96 %igem Alkohol/Benzol und in Äther. Das Trockenmaterial wird in einer Mühle pulverisiert und nach der Methode von Webb und Levy die DNS-Bestimmung durchgeführt.

A. Hydrolyse:

1. Das zu untersuchende Material wird in 3 ml 5 %iger Trichloressigsäure (TCA) suspendiert.
2. 1 - 20 mg des Trockenpulvers des Untersuchungsmaterials wird pro ml TCA gegeben. 1 - 20 mg entsprechen 5 - 150 DNA.
3. Diese Suspension wird 30 Minuten im kochenden Wasserbad hydrolisiert, dazu werden Schliffzentrifugengläser benutzt, auf die ein 30 cm langer Luftkühler mit NS 14,5 Kern gesetzt wird, um ein Verdunsten der TCA zu vermeiden.

4. Nach der Hydrolyse werden die Zentrifugengläser gekühlt (nur mit Wasser)
 5. werden zu dem Ausgangsvolumen von 3 ml zusätzlich 3 ml TCA gegeben.
 6. Der Inhalt wird gemischt und zentrifugiert.
- B. Eine Stammlösung von standardisierter und hydrolisierter DNA wird wie folgt hergestellt:
- 25 mg DNA und 20 ml 5 %ige TCA werden in einem 25 ml Meßkolben gegeben, welcher mit einem Schliffstopfen, der festgeklebt wird, versehen ist. Dieser wird 30 Min. in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Nach der Hydrolyse und der Abkühlung wird das Volumen auf 25 ml mit 5 %iger TCA gebracht. Verschiedene Konzentrationen stellt man her, in dem man Verdünnungen der Stammlösung mit 5 %iger TCA vornimmt. Die kolorimetrische Bestimmung ist identisch mit der Bestimmung bei unbekannten Trockensubstanzen.

C. Kolorimetrische Bestimmung:

1. 1 x 2 ml Anteile des hydrolisierten Materials werden in je ein Zentrifugenglas pipettiert.

2. Dazu kommt in jede Probe 2 ml TCA und anschließend 0,2 ml p-Nitrophenylhydrazinreagenz.⁺
3. Ein Reagenzienleerwert wird auf ähnliche Weise hergestellt, nur daß 4 ml 5 %ige TCA verwendet werden und 0,2 ml p-Nitrophenylhydrazin.
4. Die gesamten Proben werden dann 20 Minuten in einem kochenden Wasserbad erhitzt (siehe A, Nr. 3).
5. Nach der Abkühlung werden 10 ml n-Butylacetat zu jeder Probe gegeben.
6. Die Zentrifugengläser werden mit NS 14,5 Schliffstopfen verschlossen und mit Tesa-Industrieband verklebt und 5 Minuten geschüttelt (Schüttelwagen).
7. Die Stopfen werden wieder entfernt und zur besseren Trennung der organischen Schicht von der wässrigen Schicht werden die Proben zentrifugiert.
8. Nach der Zentrifugation wird die größere organische Phase abdekantiert und verworfen.
9. 3 ml der wässrigen Phase jeder Probe werden mit Hilfe einer Vollpipette, die man unter die Reste der organischen Schicht taucht, in ein 5 ml Meßkölbchen überführt.

⁺ Herstellung der 0,54igen p-Nitrophenylhydrazinlösung:
50 mg ad 10 ml absoluter Alkohol.

10. 1 ml 2n NaOH wird zur Entwicklung der Farbe hinzugetan.

11. Die wird dann Aqua dest. aufgefüllt und geschüttelt.

Die gefärbte Lösung wird dann zum Schluß in eine Küvette überführt und gemessen (Eppendorfspektrometer Filter 546).

Berechnung: Proben sind gegenüber Standard 1 : 3 verdünnt

$$\mu\text{g DNA/Milchdrüse} = \frac{[\mu\text{g DNA in 40 mg}] \times \text{Gewicht Trockensubstanz}}{40 \text{ mg} \times \text{Anzahl der Milchdrüsen}}$$

III. ERGEBNISSE

Whole Mount Preparation

Männliche Kontrollen: (siehe Abb. 3 a + b)

Die Milchdrüsenanlage besteht aus zwei Bezirken, die nicht miteinander in Verbindung stehen. Das Flächenwachstum dieser Bezirke ist gering und die Verzweigungsstruktur ist aufgelockert. Die Vergrößerung zeigt, daß hauptsächlich das Gangsystem stimuliert worden ist. End- und Seitenknospen sind nur zum Teil vorhanden, alveoläre Strukturen fehlen.

Weibliche Kontrollen: (siehe Abb. 4 a + b)

Ein ganz anderes Bild bieten die weiblichen Kontrollen: ein zusammenhängender Drüsenkörper ist stark ausgedehnt und bietet eine dichte Verzweigungsstruktur. Die Vergrößerung zeigt mächtig aufgetriebene Alveolen, die sich traubenförmig um die Ausführungsgänge gruppieren.

Gruppe 2: Weibchen, die vom 10. - 15. Tag ihrer fetalen Entwicklung mit Methyltestosteron behandelt wurden (siehe Abb. 5 a + b).

Der Milchdrüsenbezirk ist ebenfalls ausgedehnt und die Verzweigungsstruktur gleicht der der weiblichen Kontrollen. Die Vergrößerung ergibt jedoch eine deutliche Reduzierung der alveolären Struktur.

Gruppe 3: Weibchen, die vom 15. - 22. Tag ihrer fetalen Entwicklung mit Methyltestosteron behandelt wurden (siehe Abb. 6 a + b).

Diese Gruppe bietet ein Bild, daß mit dem der männlichen Kontrollen vergleichbar ist. Ein einzelner Drüsenbezirk zeigt eine nur sehr geringe Ausdehnung und eine aufgelockerte Verzweigungsstruktur. Die Vergrößerung läßt erkennen, daß lediglich das Gangsystem stimuliert wurde in Form einer mächtigen Lumenvergrößerung. End- und Seitenknospen sind vereinzelt vorhanden, Alveolen fehlen gänzlich.

Gruppe 8: Weibchen, die vom 1. - 10. Lebenstag mit Methyltestosteron behandelt wurden (siehe Abb. 7 a + b).

Der Drüsenkörper hat eine mächtige Ausdehnung erfahren und in der Vergrößerung bietet sich das Bild von aufgetriebenen Alveolen, die sich traubenförmig um die Ausführungsgänge lagern.

Gruppe 5: Männchen, die vom 10. - 15. Tag ihrer fetalen Entwicklung mit Cyproteronacetat behandelt wurden (siehe Abb. 8 a + b).

Der Drüsenkörper stellt sich als verhältnismäßig stark ausgedehnt dar, jedoch zeigt die Vergrößerung, daß lediglich das Gangsystem stimuliert wurde. Andeutungen von End- und Seitenknospen sind ersichtlich, alveoläre Strukturen fehlen.

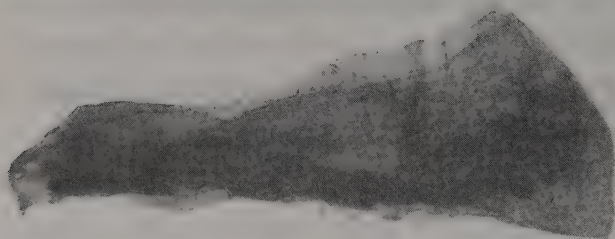
Gruppe 6: Männchen, die vom 15. - 22. Tag ihrer fetalen Entwicklung mit Cyproteronacetat behandelt wurden (siehe Abb. 9 a + b).

Das Bild ist mit dem der weiblichen Kontrollen nahezu identisch. Der Drüsenkörper ist mächtig ausgedehnt und besitzt eine dichte Verzweigungsstruktur. Die Vergrößerung

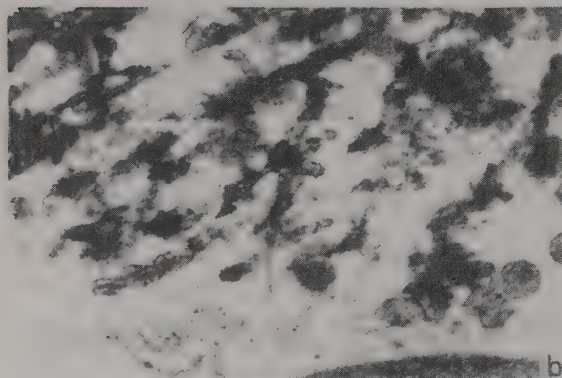
zeigt ballonförmig aufgetriebene Alveolen, die in typischer Art um die Ausführungsgänge angeordnet sind.

Gruppe 10: Männchen, die vom 1. - 10. Lebenstag mit
Cyproteronacetat behandelt wurden (siehe
Abb. 10 a + b).

Das Bild ist mit dem der männlichen Kontrollen vergleichbar. Zwei nicht zusammenhängende, mäßig ausgedehnte Drüsenbezirke zeigen eine lockere Verzweigungsstruktur. In der Vergrößerung erkennt man lediglich die Stimulation des Gangsystems. End- und Seitenknospen sind mäßig vorhanden, alveoläre Strukturen fehlen.



a



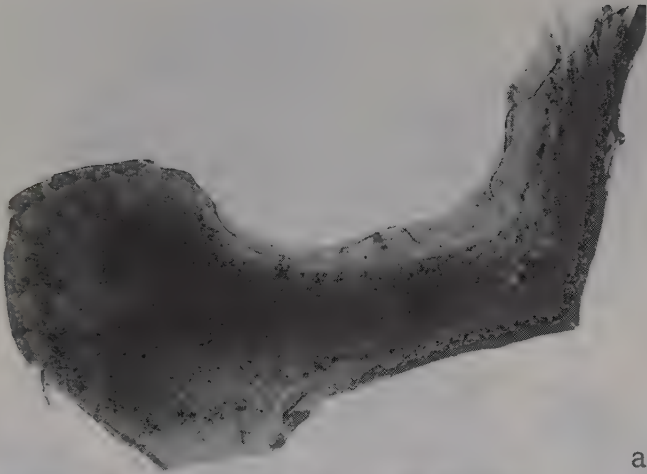
b

Abbildung 3

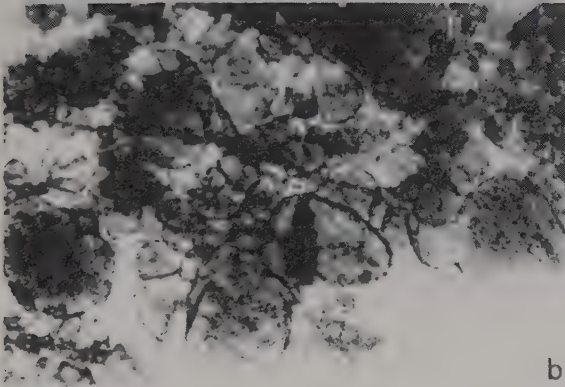
Whole Mount Preparation von den männlichen Kontrollen.

Vergrößerung: a) 0,8 x

b) 40 x



a



b

Whole Mount Preparation von den weiblichen Kontrollen.

Vergrößerung: a) 0,8 x

b) 40 x

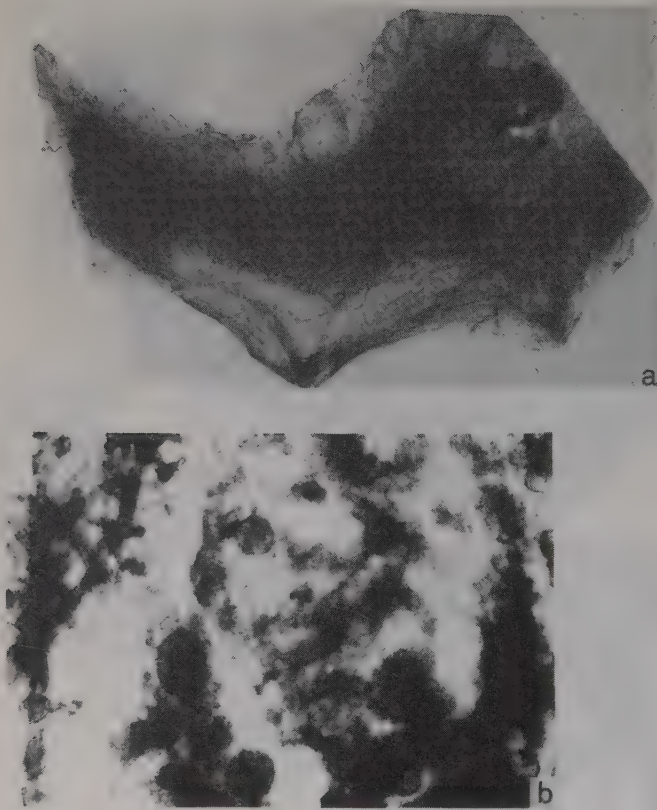


Abbildung 5

Whole Mount Preparation von Gruppe 2, weibliche Ratten
behandelt vom 10. - 15. Tag pränatal.

Vergrößerung: a) 0,8 x

b) 40 x

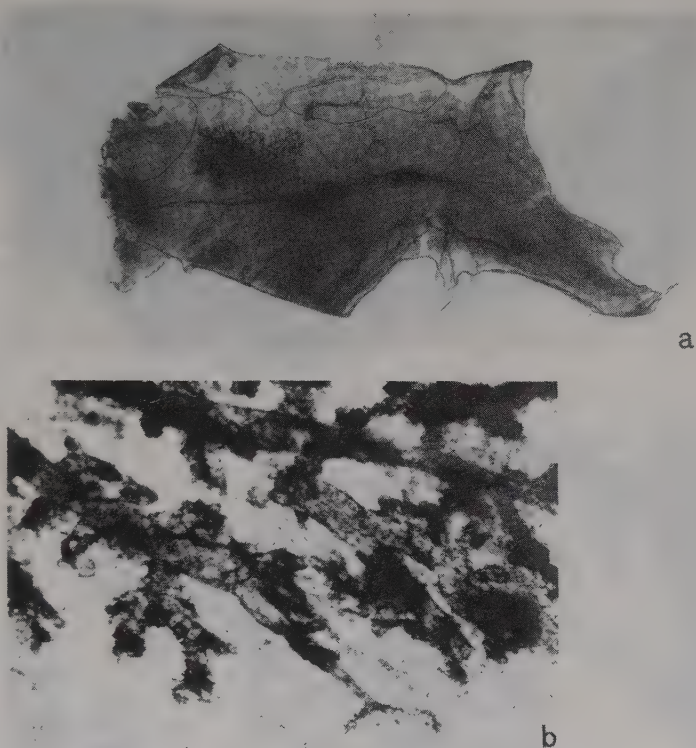
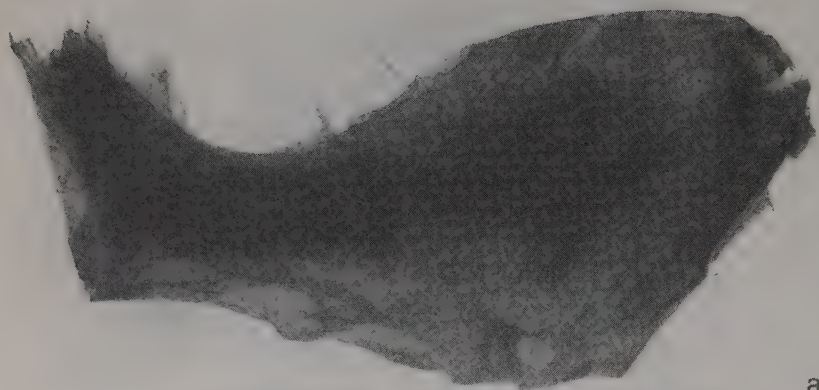


Abbildung 6

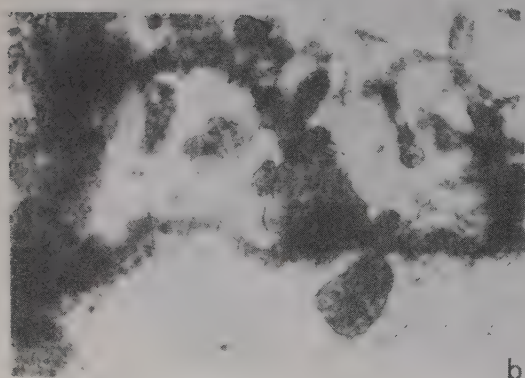
Whole Mount Preparation von Gruppe 3, weibliche Ratten
behandelt vom 15. - 22. Tag pränatal.

Vergrößerung: a) 0,8 x

b) 40 x



a

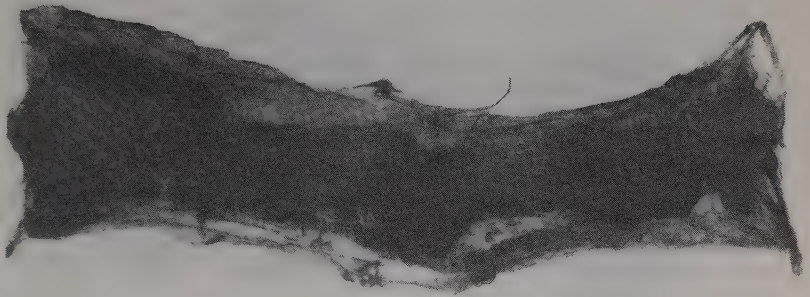


b

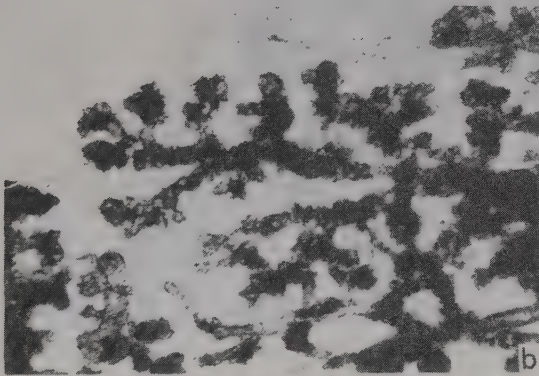
Abbildung 7

Whole Mount Preparation von Gruppe 8, weibliche Ratten
behandelt vom 1. - 10. Tag postnatal.

Vergrößerung: a) 0,8 x
b) 40 x



a



b

Abbildung 8

Whole Mount Preparation von Gruppe 5, männliche Ratten
behandelt vom 10. - 15. Tag pränatal.

Vergrößerung: a) 0,8 x
b) 40 x

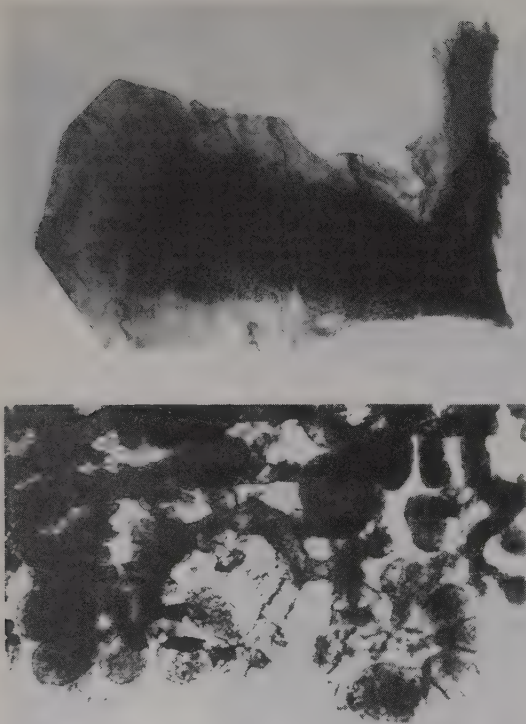
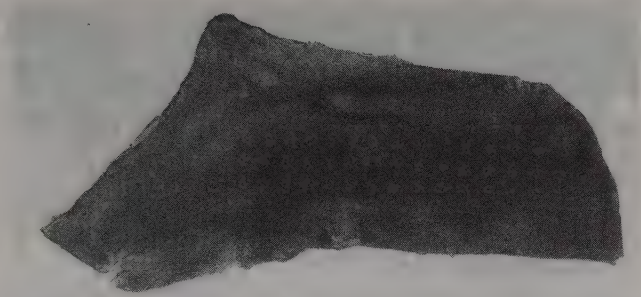


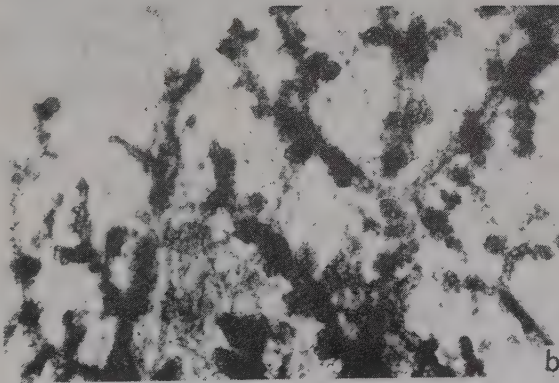
Abbildung 9

Whole Mount Preparation von Gruppe 6, männliche Ratten
behandelt vom 15. - 22. Tag pränatal.

Vergrößerung: a) 0,8 x
b) 40 x



a



b

Abbildung 10

Whole Mount Preparation von Gruppe 10, männliche Ratten
behandelt vom 1. - 10. Tag postnatal.

Vergrößerung: a) 0,8 x

b) 40 x

Histologie

Die histologischen Bilder bestätigen in eindrucksvoller Art die Befunde der Whole Mount Preparation. Von jedem Bild wurde ein vergrößerter Ausschnitt angefertigt, der die jeweils typischen Strukturen hervorheben soll.

Weibliche Kontrollen: (siehe Abb. 11 a + b)

Sie zeigen das Bild einer maximal stimulierten Milchdrüse. Das Fettgewebe ist zugunsten des Drüsenparenchyms stark zurück gedrängt. Die Alveolen sind mit Sekret gefüllt und mächtig aufgetrieben. Im vergrößerten Ausschnitt erkennt man die voll in Gang befindliche apokrine Sekretion.

Männliche Kontrollen: (siehe Abb. 12 a + b)

Man erkennt eine deutliche Stimulation des Gangwachstums, Zeichen der direkten Östradiolwirkung, und eine nur geringe Parenchymstimulation (Vergrößerung): wenige Acini und mit Sekret gefüllte Alveolen sind teils vereinzelt, teils in traubenförmiger Anordnung vorhanden. Vorherrschend ist das Fettgewebe, das von einzelnen Bindegewebssepten

durchzogen ist. Im Vergleich zu den weiblichen Kontrollen ist es das Bild einer unterentwickelten und inaktiven Drüse. Von einem vollen lobulo-alveolären Aufbau kann nicht die Rede sein.

Gruppe 2: Weibchen, die vom 10. - 15. Tag ihrer fetalen Entwicklung mit Testosteron behandelt wurden (siehe Abb. 13 a + b).

Im Vergleich zu den weiblichen Kontrollen ist bei dieser Gruppe der alveoläre Aufbau deutlich reduziert. Auffallend ist dem gegenüber eine enorme Stimulation des Gangsystems.

Gruppe 3: Weibchen, die vom 15. - 22. Tag ihrer fetalen Entwicklung mit Testosteron behandelt wurden (siehe Abb. 14 a + b).

Das Bild ist mit dem der männlichen Kontrollen vergleichbar: eine sehr geringe Parenchymstimulation mit traubenförmigen Ansammlungen von Acini und vereinzelt, mit Sekret gefüllten Alveolen. Die Stimulation des Gangwachstums ist wesentlich stärker ausgeprägt. Insgesamt ist es das Bild einer inaktiven Drüse.

Gruppe 8: Weibchen, die vom 1. - 10. Lebenstag mit
Testosteron behandelt wurden
(siehe Abb. 15 a + b).

Hier bietet sich wieder das Bild einer vollstimulierten Milchdrüse. Die Alveolen sind prall mit Sekret gefüllt und liegen dicht aneinander. Das Fettgewebe ist stark zurück gedrängt. Die Vergrößerung zeigt sehr schön die traubenförmige Anordnung der Alveolen um einen Ausführungsgang.

Gruppe 5: Männchen, die vom 10. - 15. Tag ihrer fetalen
Entwicklung mit Cyproteronacetat behandelt
wurden (siehe Abb. 16 a + b).

Diese Gruppe unterscheidet sich nicht im wesentlichen von den männlichen Kontrollen. Vorherrschend ist das Fettgewebe, das von Bindegewebssepten durchzogen ist. Zu einem alveolären Aufbau ist es nicht gekommen, vereinzelt sind acinäre Strukturen zu erkennen. Das Gangwachstum hingegen ist überreichlich stimuliert worden.

Gruppe 6: Männchen, die vom 15. - 22. Tag ihrer fetalen
Entwicklung mit Cyproteronacetat behandelt
wurden (siehe Abb. 17 a + b).

Das Bild ist nahezu identisch mit dem der weiblichen Kontrollen: prall gefüllte und mächtig aufgetriebene

Alveolen liegen dicht aneinander und die Vergrößerung zeigt eine voll leistungsfähige Drüse.

Gruppe 10: Männchen, die vom 1. - 10. Lebenstag mit
Cyproteronacetat behandelt wurden
(siehe Abb. 18 a + b).

Das Bild ist wieder mit dem der männlichen Kontrollen vergleichbar. In der Vergrößerung sieht man in charakteristischer Weise quergetroffene, stark erweiterte Ausführungsgänge. Das Drüsenparenchym ist dagegen nur sehr gering entwickelt.

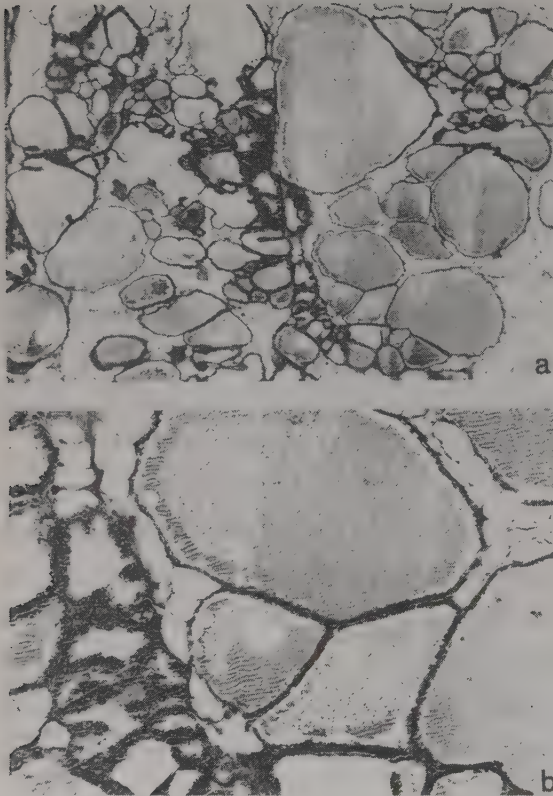


Abbildung 11

Histologie von den weiblichen Kontrollen.

Vergrößerung: a) 64 x

b) 160 x

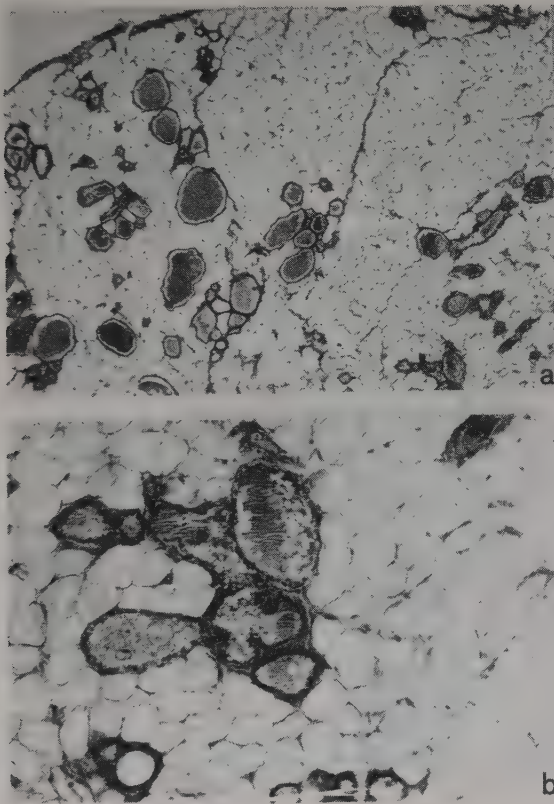


Abbildung 12

Histologie von den männlichen Kontrollen.

Vergrößerung: a) 64 x

b) 160 x

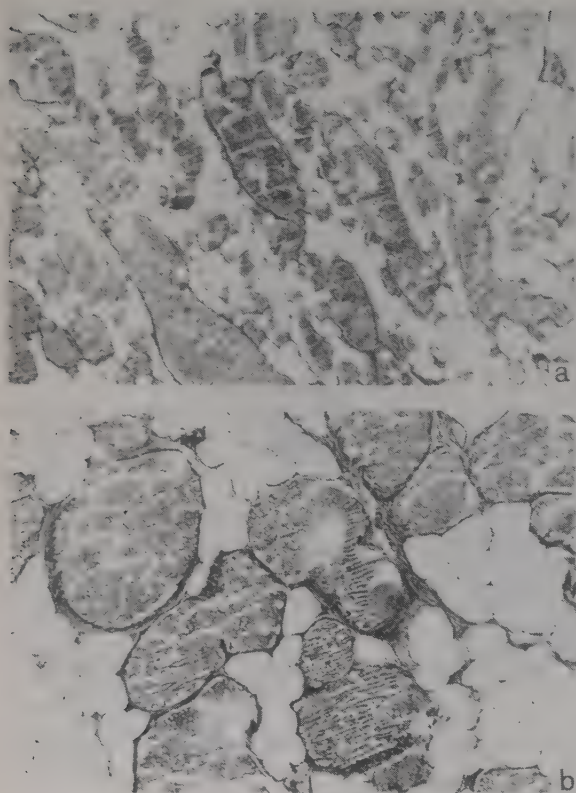


Abbildung 13

Histologie von Gruppe 2, weibliche Ratten behandelt vom
10. - 15. Tag pränatal.

Vergrößerung: a) 64 x

b) 160 x

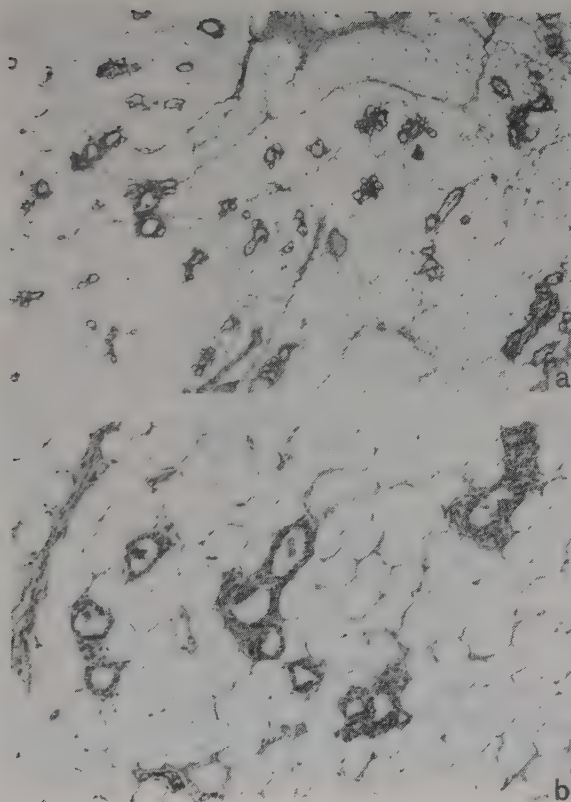


Abbildung 14

Histologie von Gruppe 3, weibliche Ratten behandelt vom
15. - 22. Tag pränatal.

Vergrößerung: a) 64 x

b) 160 x

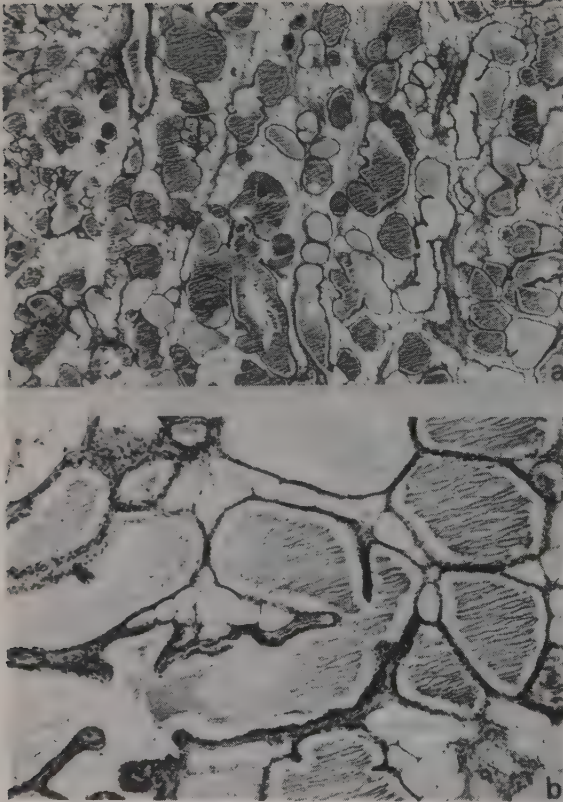


Abbildung 15

Histologie von Gruppe 8, weibliche Ratten behandelt vom
1. - 10. Tag postnatal.

Vergrößerung: a) 64 x

b) 160 x

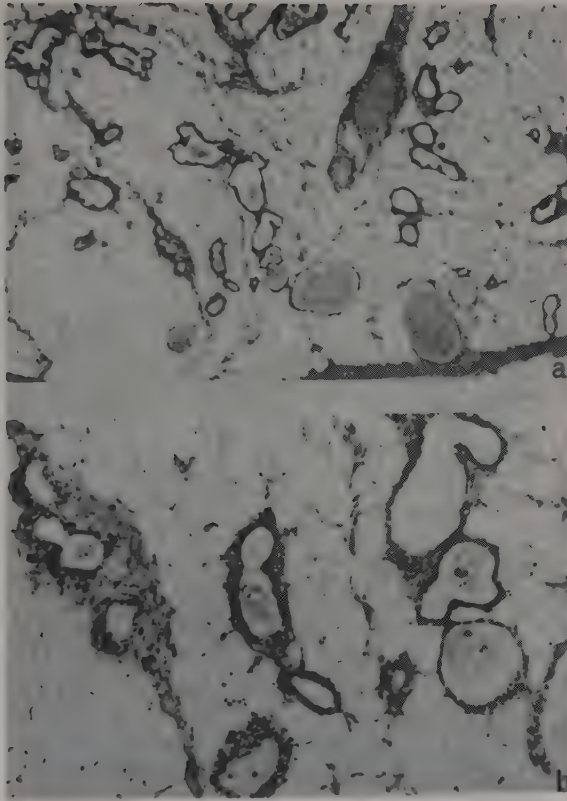


Abbildung 16

Histologie von Gruppe 5, männliche Ratten behandelt vom
10. - 15. Tag pränatal.

Vergrößerung: a) 64 x

b) 160 x

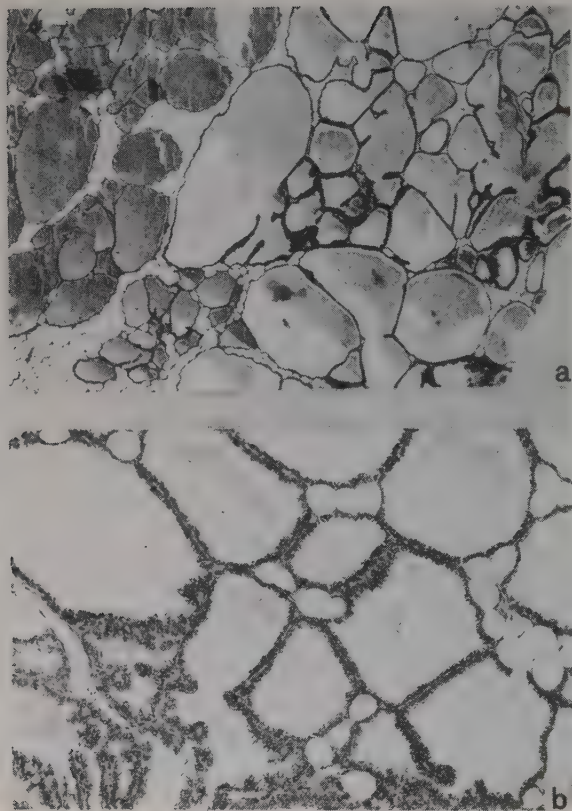


Abbildung 17

Histologie von Gruppe 6, männliche Ratten behandelt vom
15. - 22. Tag postnatal.

Vergrößerung: a) 64 x

b) 160 x

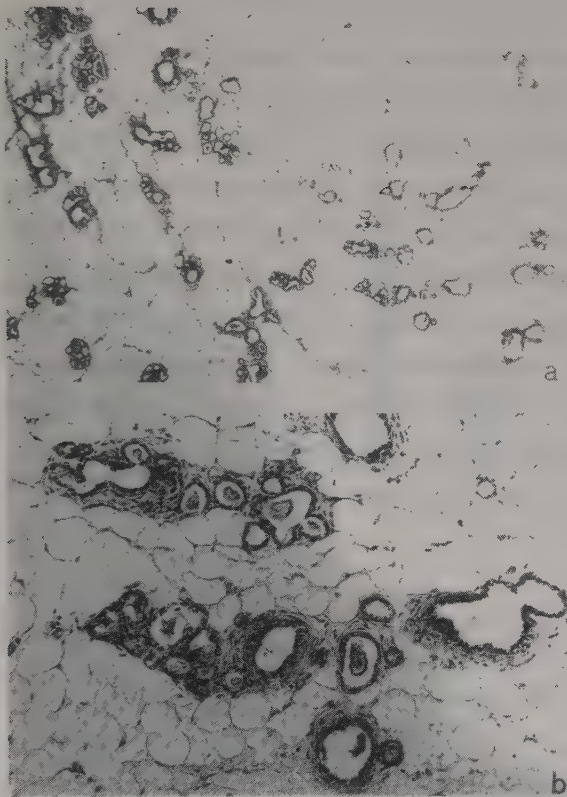


Abbildung 18

Histologie von Gruppe 10, männliche Ratten behandelt vom
1. - 10. Tag postnatal.

Vergrößerung: a) 64 x

b) 160 x

Milchdrüsengewichte (Abb. 19 und Tabelle 2)

Bei den männlichen Tieren, die mit Cyproteronacetat behandelt wurden, weist nur die Gruppe 6 (Behandlungszeit: 15. - 22. Schwangerschaftstag) eine signifikante Abweichung, im Sinne einer Gewichtszunahme, gegenüber den Kontrollen auf. Bei den weiblichen Tieren, die mit Methyltestosteron behandelt wurden, zeigen Gruppe 3 (Behandlungszeit: 15. - 22. Schwangerschaftstag) und Gruppe 2 (Behandlungszeit: 10. - 15. Schwangerschaftstag) signifikante Unterschiede, im Sinne einer Gewichtsabnahme, zu den Kontrolltieren. Abweichend vom Gewichtsverhalten der männlichen Tiere zeigt hier jedoch die Gruppe 2 die niedrigsten Werte.

DNS-Bestimmung (Abb. 20)

Die Ergebnisse sind mit denen der Milchdrüsengewichte vergleichbar: Die Gruppen 2, 3 und 6 weisen signifikante Abweichungen gegenüber den Kontrollen auf, wobei auch hier auffallenderweise die Gruppe 2 die größte Beeinflussung erfahren zu haben scheint.

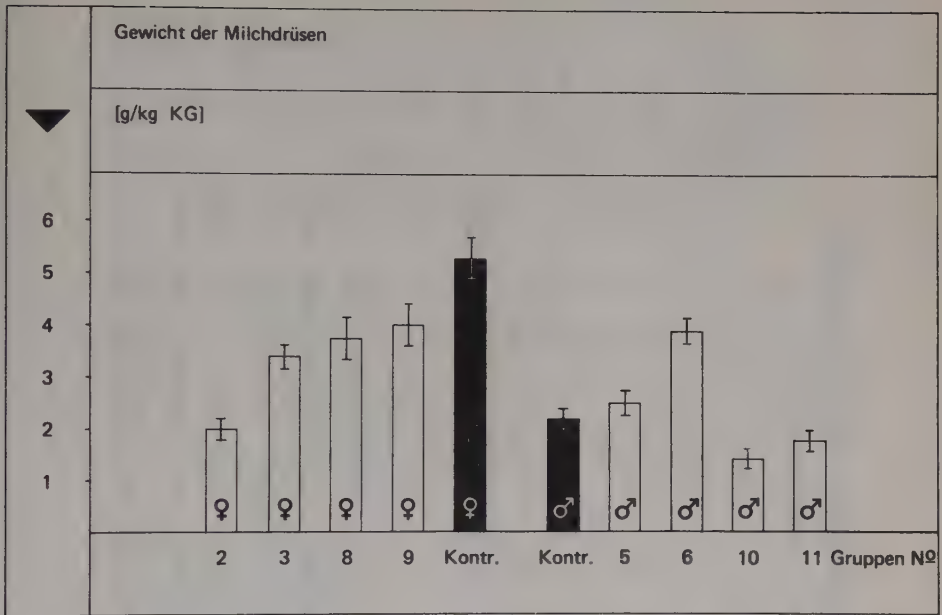


Abbildung 19

Weibchen behandelt mit Methyltestosteron.

Gruppe 2 vom 10. - 15. Tag pränatal 10 mg/die

Gruppe 3 vom 15. - 22. Tag pränatal 10 mg/die

Gruppe 8 vom 1. - 10. Tag postnatal 0.3 mg/die

Gruppe 9 vom 10. - 20. Tag postnatal 0.3 mg/die

Männchen behandelt mit Cyproteronacetat.

Gruppe 5 vom 10. - 15. Tag pränatal 10 mg/die

Gruppe 6 vom 15. - 22. Tag pränatal 10 mg/die

Gruppe 10 vom 1. - 10. Tag postnatal 0.3 mg/die

Gruppe 11 vom 10. - 20. Tag postnatal 0.3 mg/die

Statistische Auswertung durch den Computer:

(U-Test siehe Tabelle 2)

Tabelle 2

GRUPPE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1			2	1			2			1	5
2	5.0		-	5	-	-	-	-	-	1	2
3	0.0	3.0			1	1			1	10	1
4	0.0	2.0	9.0		1	1	-	-	1	-	1
5	12.0	14.0	1.0	0.0			1			1	1
6	16.0	10.0	0.0	0.0	23.0		1	5	-	1	-
7	2.0	8.0	16.0	11.0	6.0	3.0			1	2	1
8	6.0	10.0	12.0	11.0	16.0	12.0	24.0		1	2	1
9	15.0	6.0	0.0	0.0	25.0	31.0	2.0	8.0		1	1
10	0.0	1.0	7.0	18.0	0.0	0.0	9.0	10.0	0.0		1
11	3.0	2.0	0.0	0.0	4.0	16.0	1.0	1.0	8.0	0.0	

SIGNIFIKANZSCHLUESSEL

- = KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED (P GROESSER 0,10 / ZWEISEITIGER TEST)

10 = SIGNIFIKANZ AUF DEM 10%-NIVEAU (P KLEINER/GLEICH 0,10 / ZWEISEITIGER TEST)

5 = SIGNIFIKANZ AUF DEM 5%-NIVEAU (P KLEINER/GLEICH 0,05 / ZWEISEITIGER TEST)

2 = SIGNIFIKANZ AUF DEM 2%-NIVEAU (P KLEINER/GLEICH 0,02 / ZWEISEITIGER TEST)

1 = SIGNIFIKANZ AUF DEM 1%-NIVEAU (P KLEINER/GLEICH 0,01 / ZWEISEITIGER TEST)

* = STICHPROBENUMFANG FUER EINE ENTSCHEIDUNG AUF DEM 10%-NIVEAU ZU KLEIN

Legende zur Tabelle 2

Zu beachten ist, daß die Gruppeneinteilung durch den Computer (im folgenden Text in Klammern stehend) nicht der Einteilung auf Abbildung 19 entspricht.

Die statistische Auswertung zeigt, daß bei den weiblichen Gruppen, die mit Methyltestosteron behandelt wurden (Gruppe 2 (3), 3 (5), 8 (1) und 9 (6)), die Gruppen 2 (3) und 3 (5) signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (11) aufweisen (Signifikanz auf dem 1 %-Niveau).

Bei den männlichen Gruppen, die mit Cyproteronacetat behandelt wurden (Gruppe 5 (8), 6 (9), 10 (10) und 11 (4)), zeigt nur die Gruppe 6 (9) eine signifikante Abweichung gegenüber den Kontrollen (7). (Signifikanz auf dem 1 %-Niveau).

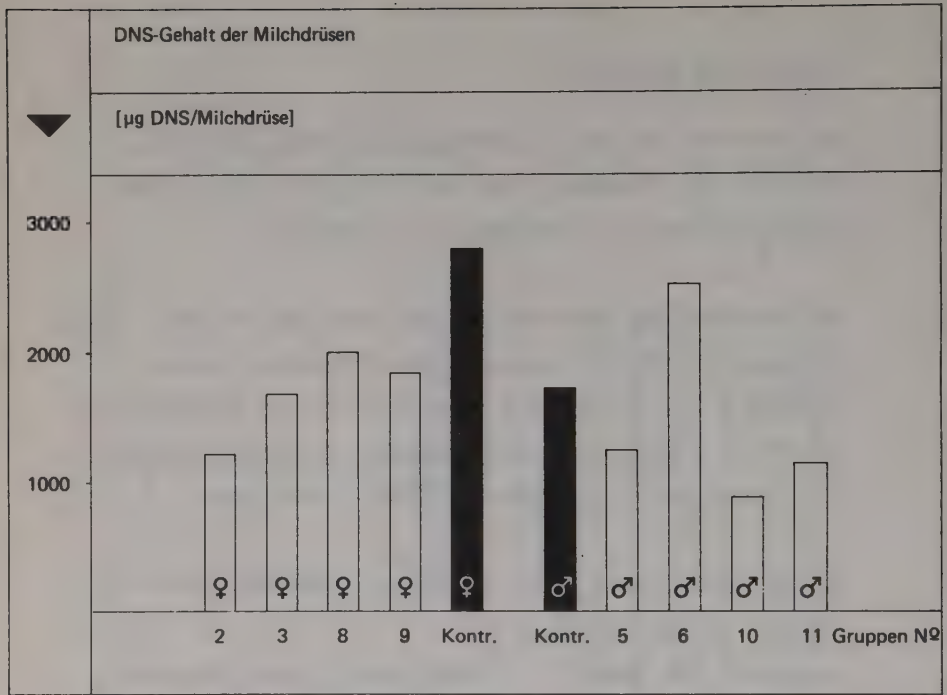


Abbildung 20

Weibchen behandelt mit Methyltestosteron.

Gruppe 2 vom 10. - 15. Tag pränatal 10 mg/die

Gruppe 3 vom 15. - 22. Tag pränatal 10 mg/die

Gruppe 8 vom 1. - 10. Tag postnatal 0.3 mg/die

Gruppe 9 vom 10. - 20. Tag postnatal 0.3 mg/die

Männchen behandelt mit Cyproteronacetat.

Gruppe 5 vom 10. - 15. Tag pränatal 10 mg/die

Gruppe 6 vom 15. - 22. Tag pränatal 10 mg/die

Gruppe 10 vom 1. - 10. Tag postnatal 0.3 mg/die

Gruppe 11 vom 10. - 20. Tag postnatal 0.3 mg/die

Die Ergebnisse der Milchdrüsengewichte und der DNS-Bestimmung sind also nur bei den männlichen Behandlungsgruppen eine Bestätigung der Whole Mount Preparation und der Histologie. Zwar zeigen die Milchdrüsen der Gruppe 2 in der Whole Mount Preparation und der Histologie schon eine deutliche Reduzierung im Milchdrüsenaufbau, der Grad der Reduzierung kommt jedoch in den Befunden der Milchdrüsengewichte und der DNS-Bestimmung wesentlich stärker zum Ausdruck.

Das unterschiedliche Verhalten der weiblichen und männlichen Behandlungsgruppen ist wohl durch die unterschiedliche Pharmakokinetik des Cyproteronacetats und des Methyltestosterons zu erklären: während das Cyproteronacetat sich durch eine kurze Verweildauer im foetalen Organismus auszeichnet, vermutet man von anderen Untersuchungen her beim Methyltestosteron eine wesentlich längere Verweildauer. (Es existieren allerdings nur beim Cyproteronacetat exakte Untersuchungen darüber, während sie beim Methyltestosteron noch ausstehen). Das bedeutet, daß bei den Tieren, denen Methyltestosteron appliziert wurde, auch diejenigen eine Beeinflussung erfahren haben müssen, die vor dem Zeitpunkt der zentralen Differenzierung

behandelt wurden (Gruppe 2). Nur bei den mit Cyproteron-
acetat behandelten Gruppen stimmt die Behandlungszeit
genau mit der Differenzierungsphase überein (Gruppe 6).

IV. DISKUSSION

Begründung des Versuchsmodells

Das Versuchsmodell basiert auf folgenden Fakten:

Bei weiblichen und männlichen Ratten ist nur die Milchdrüse das gemeinsame Erfolgsorgan von Prolaktin. Die Milchdrüse bildet daher die Grundlage des Versuchs. Prolaktin besitzt neben seiner luteotropen Funktion Eigenschaften, die es zum wichtigsten Faktor im mammogenen Hormonkomplex machen. Ein voller lobulo-alveolärer Milchdrüsenaufbau ohne Prolaktin ist nicht möglich. (Reece und Leonhard 1939, 1942, Lyons, Simpson und Evans 1942, Lyons 1958, Nelson 1950, 1952, Lyons et al. 1953, Lyons, Li und Johnson 1958).

Ein hypothalamisches Kerngebiet hemmt permanent durch Bildung eines Neurosekretes (PIF) die hypophysäre Prolaktinsekretion. Ein Senkung des PIF führt zu einer erhöhten Prolaktinausschüttung (McCann und Friedmann 1960, Nicoll und Meites 1962, Sawyer et al. 1963, Kanematsu, Hilliard und Sawyer 1963, Kobayashi et al. 1963, Ben-David, Dikstein und Sulman 1964, Ramirez und McCann 1964, Grosvenor,

McCann und Nallar 1965, Nikitovitch-Winer 1965, Mishkinsky, Lajtos und Sulman 1966, Robboy und Kahn 1966, DeVoe, Ramirez und McCann 1966, Kuroshima et al. 1966, Sar und Meites 1967, Arimuro et al. 1967, Grosvenor et. al. 1967, Dhariwal et al. 1968).

Die Differenzierung dieses hypothalamischen PIF-Zentrums ist androgenabhängig (von Hasselbach 1970).

Androgene, kommen sie während der Differenzierungsphase zur Wirkung - wie in der Natur bei männlichen Tieren und im Experiment bei Weibchen, die in ihrer fetalen und neonatalen Entwicklung mit Testosteronpropionat behandelt wurden - programmieren vermutlich das Zentrum in dem Sinne, daß die Empfindlichkeit der entsprechenden Rezeptoren für einen adäquaten Reiz herabgesetzt ist. Bei Fehlen der Androgene - wie in der Natur bei weiblichen Tieren und im Experiment bei Männchen, die in ihrer fetalen und neonatalen Entwicklung mit Anti-androgenen behandelt wurden - ist die Empfindlichkeit erhöht. Ein gleichstarker adäquater Reiz bewirkt im ersten Fall eine geringere Senkung des PIF und somit eine geringere Bildung und Ausschüttung von Prolaktin im Hypophysenvorderlappen als im letzteren.

Eine Senkung des PIF ist optimal nur durch Östradiol zu erreichen. Da Östradiol selbst keinen direkten geschlechtsspezifischen Einfluß auf die Milchdrüsendifferenzierung hat und ohne eine intakte hypothalamo-hypophysäre Verbindung nur eine bei beiden Geschlechtern gleichmäßige Stimulierung des Gangwachstums bewirkt (von Hasselbach 1970) ist Östradiol in unserem Versuch der adäquate Reiz für eine Prolaktinausschüttung.

Progesteron induziert zusammen mit Prolaktin die vollständige lobulo-alveoläre Entwicklung.

Eine Kombinationsbehandlung Östradiol/Progesteron über 22 Tage (Induktion einer Pseudoschwangerschaft) ermöglicht ein optimales Zusammenwirken der mammogenen Hormone. Der Grad der Milchdrüsendifferenzierung am Ende dieser Behandlung ist demnach ein Parameter für die Arbeitsweise des hypothalamischen PIF-Zentrums.

Ein weiblicher Reaktionstyp hat mit einer erhöhten Senkung des PIF bzw. erhöhter Stimulation der Prolaktinsekretion geantwortet. Ein vollständiger lobulo-alveolärer Milchdrüsenaufbau ist gewährleistet.

Beim männlichen Reaktionstyp hat sich die PIF-Sekretionsrate, wenn überhaupt, dann nur unwesentlich gesenkt.

Der Milchdrüsenaufbau muß unvollständig bleiben.

Die Interpretation der Ergebnisse

Um den Zeitpunkt zu bestimmen, in der bei Ratten die androgenabhängige Differenzierung des PIF-Zentrums erfolgt, haben wir zwei Untersuchungen vorgenommen. In den verschiedenen Stadien der fetalen und neonatalen Entwicklung wurden

1. männliche Tiere mit dem Antiandrogen Cyproteronacetat und
2. weibliche Tiere mit dem Androgen 17α -Methyltestosteron behandelt.

Fällt nun die Behandlungszeit mit dem Zeitpunkt der Differenzierung zusammen, so müssen die jeweiligen Gruppen eine deutliche Abweichung in Bezug auf die Milchdrüsenentwicklung gegenüber den Kontrollen aufweisen.

Eine klare Beantwortung der Fragestellung wird möglich sein, wenn die so ermittelte Differenzierungsphase bei den weiblichen und männlichen Tieren übereinstimmen.

Die Untersuchungen ergaben, daß bei den männlichen Ratten die Milchdrüsen derjeniger Tiere eine signifikante Ab-

weichung gegenüber den Kontrollen aufweisen, die vom 15. - 22. Schwangerschaftstag (Gruppe 6) und bei den weiblichen Tieren, die vom 10. - 15. (Gruppe 2) und vom 15. - 22. Schwangerschaftstag (Gruppe 3) behandelt wurden. Unter Berücksichtigung der längeren Verweildauer des Methyltestosterons im Organismus kann somit angenommen werden, daß die androgenabhängige Differenzierung des PIF-Zentrums in der letzten Schwangerschaftswoche erfolgt.

Die männlichen Ratten konnten durch Ausschaltung der Androgene mit Antiandrogen zum weiblichen Reaktionstyp programmiert werden, was in zweifacher Hinsicht von Bedeutung ist:

1. ist es eine Bestätigung des von Wiesner formulierten Prinzips der "Basic femalness" (Wiesner 1934) und
2. läßt es den Schluß zu, daß die Androgene des fetalen Hodens für die Determinierung des männlichen Reaktionstypes verantwortlich sind.

Die Hemmung bzw. Stimulation der hypophysären Prolaktinsekretion haben wir indirekt durch den Prolaktineffekt am Zielorgan, der Milchdrüse, gemessen.

Die vierfache Auswertung der Milchdrüsenentwicklung

1. Whole Mount Preparation
2. Histologie
3. Gewicht
4. DNS-Gehalt

gestattet eine ziemlich exakte Aussage über den Grad der hypophysären Prolaktinsekretion und somit auch über die Arbeitsweise des PIF-Zentrums.

Die Forderung nach einer sicheren Aussage wird jedoch nur die radioimmunologische Prolaktinmessung im Serum erfüllen können.

Erstaunlich ist, daß die Differenzierung des PIF-Zentrums in der letzten Schwangerschaftswoche erfolgt, während die Differenzierung der die Sexualfunktionen und das sexuelle Verhalten regulierenden Zentren in den ersten Tagen der neonatalen Entwicklung sich vollzieht.

Arbeiten in jüngster Zeit bestätigen die Hypothese der unterschiedlichen Arbeitsweise des positiven "feed-back"-Mechanismus bei männlichen und weiblichen Individuen:

Eine japanische Forschergruppe (Hayashi 1967 a, b, 1969) hat androgenisierte weibliche Ratten im Erwachsenenalter kastriert und gleichzeitig die Ovarien in die Milz implantiert. Danach wurden die Tiere mit Östradiol behandelt. Bekanntlich kommt es dann zu einer starken Luteinisierung der Ovarien. Die Luteinisierung war jedoch bei den weiblichen Kontrollen viel stärker als bei den androgenisierten Tieren.

Welcher Art die Differenzierung des hypothalamischen PIF-Zentrums ist, bleibt noch völlig im Unklaren. Hier kann nur die Vermutung geäußert werden, daß durch die Androgene möglicherweise die Empfindlichkeit entsprechender Rezeptoren beeinträchtigt wird.

Als eine Unterstützung dieser Rezeptortheorie können die Untersuchungsergebnisse einer finnischen Forschergruppe gewertet werden (Tuohimaa und Johansson 1971): Eine Behandlung weiblicher Ratten mit radioaktiv markiertem Östradiol (Östradiol- H^3) ergab einen wesentlich größeren Anstieg der Radioaktivität im vorderen und mittleren Hypothalamus als in anderen Teilen des ZNS. In diesen Regionen sind das PIF-Zentrum und die

Zentren, die die Gonadotropinsekretion regulieren, lokalisiert. Vergleichsuntersuchungen mit radioaktiv markiertem Testosteron (Testosteron- H^3) ergaben, daß dieser Anstieg spezifisch für Östradiol ist. Diese erhöhte Östradiol-Bindungskapazität ist jedoch bei androgenisierten weiblichen Ratten verschwunden.

Inwieweit die an Ratten gewonnenen Befunde und Erkenntnisse auf andere Spezies übertragbar sind, bleibt abzuwarten. Beim Menschen jedoch sprechen einige klinische Beobachtungen dafür, daß die Milchdrüsendifferenzierung ebenfalls einer hormonellen Prägung unterliegt.

Beim kongenitalen adrenogenitalen Syndrom, dem eine Fehlsteuerung der Hormonproduktion der Nebennierenrinde aufgrund eines Enzymdefektes zugrunde liegt und bei dem es infolge erhöhter ACTH-Ausschüttung zur vermehrten Bildung von adrenalen Androgenen kommt, sieht man bei Mädchen neben anderen Fehlbildungen mitunter auch eine unterentwickelte Brustdrüse.

Umgekehrt findet man beim Krankheitsbild der "testikulären Feminisierung", dem eine fehlende Ansprechbarkeit des Gewebes auf Androgene (Rezeptormangel?) zugrunde

liegt, neben einem rein weiblichen äußeren Genitale (ohne Schambehaarung mit blind endender Vagina) eine voll entwickelte weibliche Brustdrüse.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde an Ratten die androgenabhängige Differenzierung des hypothalamischen PIF-Zentrums, unter spezieller Berücksichtigung des Zeitfaktors.

Männliche und weibliche Ratten wurden in den verschiedenen Stadien der fetalen und neonatalen Entwicklung mit Cyproteronacetat bzw. 17α -Methyltestosteron behandelt. Die Tiere wurden bei einem Körpergewicht von 40 g kastriert. Im Erwachsenenalter erfolgte eine Stimulierung der hypophysären Prolaktinsekretion durch eine Kombinationsbehandlung von Östradiol und Progesteron über 22 Tage (Induktion einer Pseudoschwangerschaft). Dieselbe Behandlung erfuhren männliche und weibliche Kontrolltiere, die nicht vorbehandelt worden waren. Das Ausmaß der erfolgten Stimulierung wurde gemessen an der Wirkung des Prolaktins auf das periphere Erfolgsorgan, der Milchdrüse. Der Grad der Milchdrüsendifferenzierung wurde in vierfacher Weise ausgewertet:

1. Whole Mount Preparation
2. Histologie
3. Milchdrüsengewicht
4. DNS-Gehalt

Die Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungsbefunde, wonach die Programmierung des hypothalamischen PIF-Zentrums zum männlichen oder weiblichen Funktionstyp abhängig ist von der Anwesenheit oder Abwesenheit männlicher Geschlechtshormone während der Differenzierungsphase. Ohne Beeinflussung durch Androgene verläuft die Differenzierung grundsätzlich zum weiblichen Funktionstyp.

Damit befinden sich die Befunde im Einklang mit der durch zahlreiche Untersuchungen festgestellten androgenabhängigen Differenzierung der hypothalamischen Zentren, die die Sexualfunktion und das sexuelle Triebverhalten regulieren.

Die Ergebnisse zeigen ferner, daß die androgenabhängige Differenzierung des PIF-Zentrums in der letzten Schwangerschaftswoche erfolgt. Diese neu gewonnene Tatsache ist insofern erstaunlich, als doch die androgenabhängige Differenzierung der für die Sexualfunktion und das Sexualverhalten verantwortlichen Zentren erst in der neonatalen Entwicklung erfolgt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) AHREN, K. und M. ETIENNE - 1959 - The effect of testosterone alone and combined with insulin on the mammary glands of castrated and hypophysectomized rats. Acta endocr. (Kbh.) 30, 109.
- 2) ARIMURA, A., T. SAITO, E.E. MÜLLER, C.Y. BOWERS, S. SAWANO und A.V. SCHALLY - 1967 - Absence of prolactin-release inhibiting activity in highly purified LH-releasing factor. Endocrinology 80, 972.
- 3) ASTWOOD, E.B., C.F. GESCHICKTER und E.O. RAUSCH - 1937 - Development of the mammary gland of the rat. A study of normal, experimental and pathologic changes and their endocrine relationships. Amer.J.Anat. 61, 373.
- 4) BARNES, B.G. - 1963 - Cytologie de l'Adenohypophyse. Ed.Centre Natl.Rech.Sci. (Paris) 19-103.
- 5) BARNETT, R.J., W.D. ROTH und J. SAIZER - 1961 - The histochemical demonstration of the sites of luteotropic hormone in the rat pituitary gland. Endocrinology 69, 1047.
- 6) BARRACLOUGH, C.A. - 1961 - Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. Endocrinology 68, 62.

- 7) BARRACLOUGH, C.A. und R.A. GORSKI - 1961 - Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 68, 68.
- 8) BARRACLOUGH, C.A. und R.A. GORSKI - 1962 - Studies on mating behaviour in the androgen-sterilized female rat in relation to the hypothalamic regulation of sexual behaviour. *J.Endocr.* 25, 175.
- 9) BARRACLOUGH, C.A. und J.H. LEATHEM - 1954 - Infertility induced in mice by a single injection of testosterone propionate. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 85, 673.
- 10) BEN-DAVID, M., S. DIKSTEIN und F.G. SULMAN - 1964 - Effect of different steroids on prolactin secretion in pituitary-hypothalamus organ co-culture. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 117, 511.
- 11) BENOIT, J. und C. DALAGE - 1963 - Cytologie de l'Adeno-hypophyse. *Ed.Centre Natl. Rech.Sci. (Paris)* 434.
- 12) CHOWERS, I. und S.M. McCANN - 1967 - Comparison of the effect of hypothalamic and pituitary implants of estrogen, testosterone on reproductive system and adrenal of female rats. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 124, 260.
- 13) COLE, H.A. - 1933 - The mammary gland of the mouse, during the oestrus cycle, pregnancy and lactation. *Proc.roy.Soc.B* 114, 136.
- 14) DANTCHAKOFF, V. - 1938 a - Role des hormones dans la manifestation des instincts sexuels. *C.R.Acad.Sci. (Paris)* 206, 945.

- 15) DANTCHAKOFF, V. - 1938 b - Sur les effets de l'hormone male dans une jeune cobaye femelle traite depuis un stade embryonnaire (inversions sexuelles). C.R.Soc.Biol. (Paris) 127, 1255.
- 16) DESCLIN, J. jr. - 1963 - In: C.R.Acad.Sci. 257, 3042 zitiert nach: MEITES und NICOLL 1966.
- 17) DeVOE, W.F., V.D. RAMIREZ und S.M. McCANN - 1966 - Induction of mammary secretion by hypothalamic lesions in male rats. Endocrinology 78, 158.
- 18) DHARIWAL, A.P.S., C.E. GROSVENOR, J. ANTUNES-RODRIGUES und S.M. McCANN - 1968 - Studies on the purification of ovine prolactin-inhibiting-factor. Endocrinology 82, 1236.
- 19) DÖRNER, G. und F. DÖCKE - 1964 - A sex - specific reaction of the hypothalamo-hypophysial system of rats. J. Endocr. 30, 265.
- 20) EMMART, E.W., S.S. SPICER und R.W. BATES - 1963 - Localization of prolactin within the pituitary by specific fluorescent antiprolactin globulin. J.Histochem.Cytochem. 3, 365.
- 21) EVERETT, J.W. - 1964 - Central neural control of reproductive function of the adenohipophysis. Physiol.Rev. 44, 373.
- 22) EVERETT, J.W., C.H. SAWYER und J.E. MARKEE - 1949 - A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. Endocrinology 44, 234.

- 23) FARQUAR, M.G. und J.F. RINEHART - 1954 - Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland of castrated rats. *Endocrinology* 54, 516.
- 24) FEKETE, E. - 1938 - A comparative morphological study of the mammary gland in a high and low tumor strain of mice. *Amer.J.Path.* 14, 557.
- 25) FERGUSON, D.J. - 1956 - Endocrine control of mammary glands in C₃H mice. *Surgery* 39, 30.
- 26) FREYER, M.E. und H.M. EVANS - 1923 - Participation of the mammary gland in the changes of pseudo-pregnancy in the rat. *Anat.Rec.* 25, 108.
- 27) GARDNER, W.U. und L.C. STRONG - 1935 - The normal development of the mammary glands of virgin female mice of ten strains varying in susceptibility to spontaneous neoplasms. *Amer.J.Cancer* 25, 282.
- 28) GARDNER, W.U. und A. WHITE - 1941 - Mammary growth in hypophysectomized male mice receiving oestrogen and prolactin. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 48, 590.
- 29) GARDNER, W.U. und A. WHITE - 1942 - Mammary growth in hypophysectomized male mice. *Anat.Rec.* 82, 414.
- 30) GIROD, C. - 1962 - Identification experimentale de cellules E, source de prolactine, dans l'antehypophyse du Sing *Macacus sylvanus* L. *C.R.Soc. Biol. (Paris)* 156, 845.
- 31) GOMEZ, E.T. - 1942 - Mammary gland growth in hypophysectomized castrated guinea pigs. *Endocrinology* 31, 613.

- 32) GOMEZ, E.T. und C.W. TURNER - 1936 - Effect of hypophysectomy and replacement therapy on lactation in guinea pig. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 34, 404.
- 33) GOMEZ, E.T. und C.W. TURNER - 1937 - Hypophysectomy and replacement therapy in relation to the growth and secretory of the mammary gland. Mo.Agric.exp.Sta.Res.Bull. 259
- 34) GORSKI, R.A. und C.A. BARRACLOUGH - 1963 - Effects of low dosages of androgen on the differenciation of hypothalamic regulatory control of ovulation in the rat. Endocrinology 73, 210.
- 35) GORSKI, R.A. und J.W. WAGNER - 1965 - Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. Endocrinology 76, 226.
- 36) GREENBAUM, A.L. und F.G. GREENWOOD - 1954 - Some enzymic changes in the mammary gland of rats during pregnancy, lactation and mammary involution. Biochem.J. 56, 62.
- 37) GRIFFITH, D.R. und C.W. TURNER - 1957 - Desoxyribonucleic acid (DNA) content of mammary gland during pregnancy and lactation. Proc.Soc.exp. Biol. (N.Y.) 95, 347.
- 38) GROSVENOR, C.E., S.M. McCANN und R. NALLAR - 1965 - Inhibition of nursing-induced and stress-induced fall in pituitary prolactin concentration in lactating rats by injections of acid extracts of bovine hypothalamus. Endocrinology 76, 883.

- 39) GROSVENOR, C.E., F. MENA, A.P.S. DHARIWAL und S.M. McCANN - 1967 - Reduction of milk secretion by prolactin-inhibiting-factor; further evidence that exteroceptive stimuli can release pituitary prolactin in rats. *Endocrinology* 81, 1021.
- 40) GROSVENOR, C.E., F. MENA und D. SCHAEFGEN - 1967 - Effect of nonsuckling interval and duration of suckling on the suckling-induced fall in pituitary prolactin concentration in the rat. *Endocrinology* 81, 449.
- 41) HAHN, D.W. und C.W. TURNER - 1966 - Effect of oestrogen and progesterone on mammary gland DNA and feed intake in hypophysectomized female rats. *Proc. Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 122, 183.
- 42) HAMMOND, J.jr. und F.H.A. MARSHALL - 1930 - Oestrus and pseudo-pregnancy in the ferret. *Proc.roy. Soc.B* 105, 607.
- 43) HARKNESS, M.L.R. und R.D. HARKNESS - 1956 - The effect of pregnancy and lactation on the collagen content of the mammary gland of the rat. *J.Physiol. (Lond.)* 132, 476.
- 44) HARRIS, G.W. - 1963 - Castration of the new-born male rat and lack of sexual differentiation of the brain. *J.Physiol. (Lond.)* 169, 117.
- 45) HARRIS, G.W. - 1964 - Sex hormones, brain development and brain function. *Endocrinology* 75, 627.
- 46) HARRIS, G.W. und S. LEVINE - 1962 - Sexual differentiation of the brain and its experimental control. *J.Physiol. (Lond.)* 163, 42.

- 47) von HASSELBACH, Ch. - 1970 - Untersuchungen an Ratten über die Bedeutung der perinatalen Androgene für die Differenzierung der hypothalamischen Kerngebiete, welche die hypophysäre Prolaktinsekretion regulieren. Dissertation Schering AG, Berlin.
- 48) HAYASHI, S. - 1967 a - Difference in responsiveness to estrogen of the anterior hypophysis between normal and neonatally estrogenized rats. J. Fac.Sci. (Tokyo) 11, 227.
- 49) HAYASHI, S. - 1967 b - Difference in luteinization in intrasplenic ovarian grafts between normal and persistent-estrous rats following ovariectomy. J.Fac.Sci. (Tokyo) 11, 235.
- 50) HAYASHI, S. - 1969 - Suppression by estrogen injections of luteinization in intrasplenic ovarian grafts in ovariectomized "normal" and neonatally estrogenized rats. Annot.zool.jap. 42, 13.
- 51) HOHLWEG, W. und K. JUNKMANN - 1932 - Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens. Klin.Wschr. 11, 321.
- 52) HYMER, W.C., W.H. McSHAN und R.G. CHRISTIANSEN- 1961 - Electron microscopic studies of the anterior pituitary glands from lactating and oestrogen-treated rats. Endocrinology 69, 81.
- 53) KANEMATSU, S., J. HILLIARD und C.H. SAWYER - 1963 - Effect of reserpine on pituitary prolactin content and its hypothalamic site of action in the rabbit. Acta endocr. (Kbh.) 44, 467.

- 54) KANEMATSU, S. und C.H. SAWYER - 1963 - Effects of intrahypothalamic and intrahypophysial oestrogen implants on pituitary prolactin and lactation in the rabbit. *Endocrinology* 72, 243.
- 55) KINCL, F.A., A. FOLCH, M. MAQUEO, L. HERRERA LASSO, A. ORIOL und R.I. DORFMAN - 1965 - Inhibition of sexual development in male and female rats treated with various steroids at the age of five days. *Acta endocr. (Kbh.)* 49, 193.
- 56) KIRKHAM, W.R. und C.W. TURNER - 1953 - Nucleic acids of the mammary glands of rats. *Proc.Soc.exp. Biol. (N.Y.)* 83, 123.
- 57) KIRKHAM, W.R. und C.W. TURNER - 1954 - Induction of mammary growth in rats by estrogen and progesterone. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 87, 139.
- 58) KOBAYASHI, T., T. KIGAWA, M. MIZUNO und Y. AMENOMORI - 1963 - Prolactin secretion of rat anterior pituitary cultivated in vitro. *Endocr.jap.* 10, 199.
- 59) KUMARESAN, P. und C.W. TURNER - 1966 - Effect of neonatal administration of testosterone propionate upon mammary gland growth in female rats. *Endocrinology* 79, 443.
- 60) KURCZ, M., K. KOVACS, T. TOBOLDT und A. OROSZ - 1967 - Effect of androgenisation on adenohypophysial prolactin content in rats. *Acta endocr. (Kbh.)* 54, 663.

- 61) KUROSHIMA, A., A. ARIMURA, C.Y. BOWERS und A.V. SCHALLY
- 1966 - Inhibition by pig hypothalamic extracts
of depletion of pituitary prolactin in rats
following cervical stimulation. *Endocrinology*
78, 216.
- 62) LI, C.H. - 1957 - Studies on pituitary lactogenic
hormone. *J.biol. Chem.* 229, 157.
- 63) LI, C.H., R.D. COLE und M. COVAL - 1957 - Studies on
pituitary lactogenic hormone. *J.biol. Chem.*
229, 153
- 64) LI, C.H. und J.T. CUMMINS - 1958 - Studies on pituitary
lactogenic hormone. *J.biol.Chem.* 233, 73.
- 65) LI, C.H., I.I. GESCHWIND, A.L. LEVY, J.I. HARRIS,
J.S. DIXON, N.G. DON und J.O. PORATH - 1954 -
Isolation and properties of alfa-corticotropin
from sheep pituitary glands. *Nature (Lond.)*
173, 251.
- 66) LI, C.H., W.R. LYONS und H.M. EVANS - 1941 - Studies
on pituitary lactogenic hormone. *J.biol.Chem.*
140, 43.
- 67) LI, C.H., M.E. SIMPSON und H.M. EVANS - 1942 - Studies
on pituitary lactogenic hormone. *J.biol.Chem.*
146, 627.
- 68) LYONS, W.R. - 1942 - The direct mammatrophic action
of lactogenic hormone. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)*
51, 308.

- 69) LYONS, W.R. - 1943 - Lobulo-alveolar mammary growth induced in hypophysectomized rats by injections of hypophyseal and ovarian hormones. In: Assays in Biology, p. 317. Berkely: California University Press.
- 70) LYONS, W.R. - 1950 - Lobulo-alveolar mammary growth in the rat. In: Mechanisme physiologique de la secretion lactee. Coll.Int.du C.N.R.S. (Strasbourg) p. 29.
- 71) LYONS, W.R. - 1958 - Hormonal synergism in mammary growth. Proc.roy.Soc. B 149, 303.
- 72) LYONS, W.R., R.E. JOHNSON und C.H. LI - 1956 - Local action of pituitary and ovarian hormones on the mammary glands of hypophysectomized-oöphorectomized rats. Anat.Rec. 127, 432.
- 73) LYONS, W.R., C.H. LI, R.D. COLE und R.E. JOHNSON - 1953 - Some of the hormones required by the mammary gland in its development and function. J.clin. Endocr. 13, 836.
- 74) LYONS, W.R., C.H. LI und R.E. JOHNSON - 1956 - Direct action of mammary-stimulating hormones. J.clin. Endocr. 16, 967.
- 75) LYONS, W.R., C.H. LI und R.E. JOHNSON - 1958 - The hormonal control of mammary growth and lactation. Recent Progr.Hormone Res. 14, 219.
- 76) LYONS, W.R. und R.I. PENCHARZ - 1936 - Reactions of mammary glands of normal and hypophysectomized male guinea-pigs to female sex hormone. Proc. Soc.exp. Biol. (N.Y.) 33, 589.

- 77) LYONS, W.R., M.E. SIMPSON und H.M. EVANS - 1941 -
Influence of lactogenic preparations on mammary
glands and time of vaginal opening in young
rats. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 48, 634.
- 78) LYONS, W.R., M.E.SIMPSON und H.M. EVANS - 1942 -
Lobulo-alveolar mammary growth in hypophysectomized
rats. Anat.Rec. 82, 430.
- 79) LYONS, W.R., M.E. SIMPSON und H.M. EVANS - 1943 -
Hormonal requirement for pregnancy and mammary
development in hypophysectomized rats. Proc.Soc.
exp.Biol. (N.Y.) 52, 134.
- 80) MARSHALL, F.H.A. und E.T. HALNAN - 1917 - On the post-
oestrus changes occurring in the generative
organs and mammary glands of the non-pregnant
dog. Proc.roy.Soc. B 89, 546.
- 81) MAYER, G. und M. KLEIN - 1948 - Physiologie de la
lactation. I. Les facteurs du developpement
morphologique du parenchyme mammaire. Ann.Nutr.
(Paris) 2, 113.
- 82) McCANN, S.M. und H.M. FRIEDMAN - 1960 - The effect of
hypothalamic lesions on the secretion of luteo-
trophin. Endocrinology 67, 597.
- 83) MEITES, J. - 1954 - Recent studies on the mechanism
controlling the initiation of lactation. Rev.
canad.Biol. 13, 359.
- 84) MEITES, J. und C.S. NICOLL - 1966 - Adenohypophysis:
Prolactin. Ann.Rev.Physiol. 28, 57.

- 85) MEITES, J. und J.T. SGOURIS - 1953 - Can the ovarian hormones inhibit the mammary response to prolactin? *Endocrinology* 53, 17.
- 86) MINAGUCHI, H., J.A. CLEMENS und J. MEITES - 1968 - Changes in pituitary prolactin levels in rats from weaning to adulthood. *Endocrinology* 82, 555.
- 87) MIRSKY, A.E. und H. RIS - 1949 - Variable and constant components of chromosomes. *Nature (Lond.)* 163, 666.
- 88) MISHKINSKY, J., Z.K. LAJTOS und F.G. SULMAN - 1966 - Initiation of lactation by hypothalamic implantation of perphenazine. *Endocrinology* 78, 919.
- 89) MIXNER, J.P. und C.W. TURNER - 1942 - Role of estrogen in the stimulation of mammary lobulo-alveolar growth by progesterone and by the mammogenic lobulo-alveolar growth factor of the anterior pituitary. *Endocrinology* 30, 591.
- 90) MIXNER, J.P. und C.W. Turner - 1943 - The mammogenic hormones of the anterior pituitary. II. The lobulo-alveolar growth factor. *Mo.Agr.exp.Sta. Res.Bull.* 378
- 91) MIZUNO, H., K. IIDA und M. NAITO - 1955 - The role of prolactin in the mammary alveolus formation. *Endocr. jap.* 2, 163.
- 92) MIZUNO, H. und M. NAITO - 1956 - The effect of locally administered prolactin on the nucleic acid content of the mammary gland in the rabbit. *Endocr. jap.* 3, 227.

- 93) MOON, R.C., D.R. GRIFFITH und C.W. TURNER - 1959 - Normal and experimental growth of rat mammary gland. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 101, 788.
- 94) MUNFORD, R.E. - 1963 - Changes in the mammary glands of rats and mice during pregnancy, lactation and involution. III. Relation of structural and biochemical changes. J.Endocr. 28, 35.
- 95) MUNFORD, R.E. - 1964 - A review of anatomical and biochemical changes in the mammary gland with particular reference to quantitative methods of assessing mammary development. J.Dairy Sci. Abstr. 26, 293.
- 96) NATHANSON, I.T., D.T. SHAW und C.C. FRANSEEN - 1939 - Effect of simultaneous administration of growth complex and estradiol on mammary gland of hypophysectomized rat. Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.) 42, 652.
- 97) NELSON, W.O. - 1950 - Interrelations of steroid and hypophyseal hormones and their effects on the mammary glands. In: Mecanisme physiologique de la secretion lactee. Coll.Int.du C.N.R.S. (Strasbourg) p. 19.
- 98) NELSON, W.O. - 1952 - Hypophyseal and ovarian hormones in the regulation of the mammary glands. Ciba Found. 4, 402.
- 99) NEUMANN, F. und W. ELGER - 1965 - Physiological and psychical intersexuality of male rats by early treatment with an antiandrogenic agent (1,2 α -methylene-6-chloro- Δ^6 -hydroxy-progesterone-acetate). Acta endocr. (Kbh.) Suppl. 100, 174.

- 100) NEUMANN, F. und W. ELGER - 1967 - Steroidal stimulation of mammary glands in prenatally feminized male rats. *Europ.J.Pharmacol.* 1, 120.
- 101) NEUMANN, F., W. ELGER und R. von BERSWORDT-WALLRABE - 1967 - Intersexualität männlicher Feten und Hemmung androgenabhängiger Funktionen bei erwachsenen Tieren durch Testosteronblocker. *Dtsch.med.Wschr.* 92, 360.
- 102) NEUMANN, F., J.D. HAHN und M. KRAMER - 1967 - Hemmung von testosteronabhängigen Differenzierungsvorgängen der männlichen Ratte nach der Geburt. *Acta endocr. (Kbh.)* 54, 227.
- 103) NICOLL, C.S. und J. MEITES - 1962 - Estrogen stimulation of prolactin production by rat adenohypophysis in vitro. *Endocrinology* 70, 272.
- 104) NIKITOVITCH-WINER, M.B. - 1965 - Effect of hypophysial stalk transection on luteotropic hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 77, 658.
- 105) OLIVEREAU, M. - 1963 - Cytologie de l'Adenohypophyse. *Ed.Centre Natl.Rech.Sci. (Paris)* 315-329.
- 106) PARKES, A.S. - 1926 - Observations on the oestrus cycle of the albino mouse. *Proc.roy.Soc. B* 100, 151.
- 107) PFEIFFER, C.A. - 1936 - Sexual differences of the hypophysis and their determination by the gonads. *Amer.J.Anat.* 58, 195.

- 108) PHOENIX, C.H., R.W. GOY, A.A. GERRALL und W.C. YOUNG
- 1959 - Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behaviour in the female guinea-pig. *Endocrinology* 65, 369.
- 109) PURVES, H.D. - 1961 - Sex and Internal Secretions
Young, W.C. (ed.), chapter 1, p. 161. Williams and Wilkins, Baltimore.
- 110) RAMIREZ, V.D. und S.M. McCANN - 1964 - Induction of prolactin secretion by implants of oestrogen into the hypothalamo-hypophyseal region of female rats. *Endocrinology* 75, 206.
- 111) RATNER, A. und J. MEITES - 1964 - Depletion of prolactin inhibiting activity of rat hypothalamus by estradiol or suckling stimulus. *Endocrinology* 75, 377.
- 112) RATNER, A., P.K. TALWALKER und J. MEITES - 1963 - Effect of estrogen administration in vivo on prolactin release by rat pituitary in vitro. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 112, 12.
- 113) REECE R.P. und J.H. LEATHEM - 1945 - Growth of mammary glands of hypophysectomized rats following estrogen and lactogen administration. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 59, 122.
- 114) REECE, R.P. und S.L. LEONARD - 1939 - Further evidence for a mammogenic factor in the rat.hypophysis. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 42, 200.

- 115) REECE, R.P. und S.L. LEONARD - 1941 - Effect of oestrogen, gonadotropins and growth hormone on mammary glands of hypophysectomized rats. *Endocrinology* 29, 297.
- 116) REECE, R.P. und S.L. LEONARD - 1942 - Lobulo-alveolar growth of mammary glands of hypophysectomized female rats. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 49, 600.
- 117) REECE, R.P., C.W. TURNER und R.T. HILL - 1936 - Mammary gland development in the hypophysectomized albino rats. *Proc.Soc.exp.Biol. (N.Y.)* 34, 204.
- 118) RENNELS, E.G. - 1962 - An electron microscope study of pituitary autograft cells in the rat. *Endocrinology* 69, 713
- 119) RIDDLE, O., R.W. BATES und S.W. DYKSHORN - 1933 - The preparation, identification and assay of prolactin - a hormone of the anterior pituitary. *Amer.J.Physiol.* 105, 191.
- 120) RIESER, U., U. SCHULZ und F. NEUMANN - 1970 - Ursachen der geschlechtsunterschiedlichen Milchdrüsen-gewebsentwicklung bei Ratten. *Experientia (Basel)* 26, 1148.
- 121) ROBBOY, S.J. und R.H. KAHN - 1966 - Zone electrophoresis and prolactin activity of rat adeno-hypophysis cultivated in vitro. *Endocrinology* 78, 440.

- 122) ROTHCHILD, I. und R. DICKEY - 1960 - The corpus luteum pituitary relationship: a study of the compensatory hypertrophy of the ovary during pseudo-pregnancy and lactation in the rat. *Endocrinology* 67, 42.
- 123) SAR, M. und J. MEITES - 1967 - Changes in pituitary prolactin release and hypothalamic PIF-content during the estrous cycle of rats. *Proc.Soc. exp.Biol. (N.Y.)* 125, 1018.
- 124) SAR, M. und J. MEITES - 1968 - Effects of progesterone, testosterone and cortisol on hypothalamic PIF and pituitary prolactin content. *Proc.Soc.exp. Biol. (N.Y.)* 127, 426.
- 125) SAWYER, C.H., C.K. HAHN, J. HILLIARD, H.M. RADFORD und S. KANEMATSU - 1963 - Further evidence for the identity of hypothalamic areas controlling ovulation and lactation in the rabbit. *Endocrinology* 73, 338.
- 126) SCHULTZE, A.B. und C.W. TURNER - 1933 - Experimental initiation of milk secretion in the albino rat. *J.Dairy Sci.* 16, 129.
- 127) STEINBECK, H. - 1969 - Die Wirkung der verschiedenen Gestagene auf Morphologie und Funktion der Milchdrüse. In: Die Gestagene, Teil II; Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXII/2, Herausgeber: K. Junkmann. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York.

- 128) SULMAN, F.G., M. BEN-DAVID, A. DANON, S. DIKSTEIN, N. KHAZAN, J. MISHKINSKY und V. ZOR - 1963/64 - Studies on hypothalamic lactation. Investegation into the mechanism of lactation and its augmen-tation by hypothalamic stimulation. In: Research, Report 1963/64, The Hebrew University of Jerusalem, Israel.
- 129) SWANSON, H.E. und J.J. van der WERFF ten BOSCH - 1964 - The "early-androgen" syndrome; its development and the response to hemi-spaying. Acta endocr. (Kbh.) 45, 1.
- 130) TIXIER-VIDAL, A. - 1963 - Cytologie de l'Adenohypo-physe. Ed.Centre Natl. Rech.Sci. (Paris) 255-273.
- 131) TRAURIG, H.H. und C.F. MORGAN - 1964 a - The effect of ovarian and hypophyseal hormones on mammary gland epithelial cell proliferation. Anat.Rec. 150, 423.
- 132) TRAURIG, H.H. und C.F. MORGAN - 1964 b - Autoradio-graphic studies of the epithelium of mammary gland as influenced by ovarian hormones. Proc. Soc.exp.Biol. (N.Y.) 115, 1076.
- 133) TRENTIN, J.J. und C.W. TURNER - 1948 - The experi-mental development of the mammary gland with special reference to interaction of the pituitary and ovarian hormones. Mo.Agr.exp.Sta.Res.Bull. 418
- 134) TUCKER, H.A., M.J. PAAPE und Y.N. SINHA - 1967 - Ovariectomy and suckling intensity effects on mammary nucleic acid, prolactin and ACTH. Amer.J.Physiol. 213, 262.

- 135) TUOHIMAA, P. und R. JOHANSSON - 1971 - Decreased estradiol binding in the uterus and anterior hypothalamus of androgenized female rats. *Endocrinology* 88, 1159.
- 136) TURNER, C.W. und E.T. GOMEZ - 1933 - The normal development of the mammary gland of the male and female albino mouse. *Mo.Agr.exp.Sta.Res. Bull.* 182
- 137) TURNER, C.W. und A.B. SCHULTZE - 1931 - A study of the cause of the normal development of the mammary gland of the albino rat. *Mo.Agr.exp. Sta.Res.Bull.* 157
- 138) TURNER, C.W., R. WILLIAMS und G.A. HINDERY - 1963 - Growth of the udders of dairy heifers as measured by milk yield and deocyturiboseinucleic acid. *J.Dairy Sci.* 46, 1390.
- 139) WEBB, J.M. und H.B. LEVY - 1955 - A sensitive method for the determination of deoxyribonucleic acid in tissues and microorganisms. *J.biol.Chem.* 213, 107.
- 140) WEICHERT, C.K., R.W. BOYD und R.S. COHEN - 1934 - A study of certain endocrine effects on the mammary glands of female rats. *Anat.Rec.* 61, 21.
- 141) WHITE, A., R.W. BONSNES und C.N.H. LONG - 1942 - Prolactin. *J.biol.Chem.* 143, 447.

- 142) WIESNER, B.P. - 1934 - The postnatal development of the genital organs in the albino rat, with a discussion of a new theory of the sexual differentiation. J.Obstet.Gynaec.Brit.Emp. 41, 867.
- 143) WILLIAMS, R. und C.W. TURNER - 1961 - Growth of the calt udder using DNA as an index. J.Dairy Sci. 44, 1721.
- 144) WILSON, J.G. und W.C. YOUNG - 1941 - Sensitivity to estrogen studied by means of experimentally induced mating responses in the female guinea pig and rat. Endocrinology 29, 779.
- 145) WOLTHUIS, O.W. - 1963 - The effects of sex steroids on the prolactin content of hypophyses and serum in rats. Acta endocr (Kbh.) 43, 137.
- 146) WOLTHUIS, O.L. und S.E. deJONGH - 1963 - The prolactin production and release of a pituitary graft and of the hypophysis in situ. Acta endocr. (Kbh.) 43, 271.

VII. DANKSAGUNG

Herrn Priv.-Doz. Dr. F. Neumann danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die hilfreiche Unterstützung und freundliche Beratung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Ich möchte mich auch sehr herzlich bei den Mitarbeitern der Abteilung Endokrinpharmakologie der Schering AG, Berlin, bedanken, vor allem bei Fräulein Böhnisch, Fräulein Sperling, Frau Kostusiack, Herrn Hiller, Herrn Leidecker und Herrn Friedreich, die mir mit ihren Erfahrungen bei der technischen Bewältigung der Arbeit behilflich waren.

VIII. LEBENS LAUF

Ich wurde geboren am 17. Oktober 1941 in Weiler/Allgäu als Sohn des Johann Baptist Berger und seiner Ehefrau Laura, geb. Einsle.

Die Grundschule und das humanistische Gymnasium besuchte ich in Lindau/Bodensee. Nach bestandener Reifeprüfung im Sommer 1962 diente ich bis 1964 als Wehrpflichtiger bei der Bundeswehr.

Vom Wintersemester 1964/65 an studierte ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin und bestand im Januar 1971 das Staatsexamen. Seit dieser Zeit bin ich an verschiedenen Berliner Krankenhäusern als Medizinalassistent tätig.

